

**Charakterisierung der Ligandenbindung
am $\alpha 1$ homo- und $\alpha 1\beta$ heterooligomeren Glycinrezeptor**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Joanna Grudzinska
aus Olsztyn, Polen

Frankfurt am Main 2005
(DF1)

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Neurochemie am Max-Planck-Institut für Hirnforschung durchgeführt und vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Betz
Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation: 07.09.05

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muß sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Mögliche getan hat.“

J.W. Goethe

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Heinrich Betz für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am MPI für Hirnforschung, für seine große Begeisterung für die Wissenschaft, die er stets auf andere überträgt, für seine Diskussionsbereitschaft und für seine Unterstützung während der ganzen Arbeit.

Herrn PD Dr. Bodo Laube möchte ich ganz herzlich danken für die hervorragende fachliche Betreuung meiner Arbeit, für die interessanten wissenschaftlichen Auseinandersetzungen, für sein Verständnis, seine Gelassenheit und für seine unerschütterliche Begeisterung für alle Ergebnisse, mit der er es immer wieder geschafft hat, alle zu motivieren.

Herrn Prof. Bernd Ludwig danke ich für die Bereitschaft meine Dissertation als Vertreter des Fachbereiches Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften zu begutachten.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Neurochemie bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, indem stets eine freundschaftliche Atmosphäre und große Hilfsbereitschaft verbreitet wurde, die den Verlauf der Doktorarbeit sehr erleichtert hat.

Mein besonderer Dank gilt Andreas Langer für die Kaffeepausen ohne Kaffee, für die Aufmunterung auch in schwierigen Phasen und für die legendären Schwanheim-Partys; Iris Gotha für die unterhaltsamen und interessanten Mittagspausen, für ihre große Hilfe bei den Experimenten und für ihr offenes Ohr; Thomas Schüler für die tolle und unkomplizierte Zeit in „unserem Labor“, in der regelmäßig die Frage erörtert wurde: 15” oder 17”; Wolfgang Maier für seine rege Diskussionsbereitschaft über Gott und die Welt sowie über Bayern als Nabel der Welt; Annette Nicke für die vielen Tipps rund um die Molekularbiologie und Biochemie und vor allem für das Guacamolerezept; Gregory O’Sullivan für seine gute Laune, sein Engagement und seine Hilfe in schwierigen Zeiten, Wencke Armsen für die „Theatereinlagen“, Elena Zurkowski für die besten Kapillaren der Welt, Bertram Schmitt für seine große Hilfsbereitschaft, Melanie Bausen für die Abwechslung auf den Graduiertenkollegsfahrten, Rudolf Schemm für das Modelling und den „Frischlingen“ Ben und Christian für die Erkenntnis, dass am Anfang alles anders ist.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei Niels Goebel und meinen Eltern Janusz und Krystyna Grudzinski bedanken, die mich in allen Lebenslagen unterstützten und immer an mich geglaubt haben.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Zusammenfassung..... | I |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Ligandengesteuerte Ionenkanäle | 2 |
| 1.2 Der Glycinrezeptor | 4 |
| 1.3 Pharmakologie des GlyRs | 6 |
| 1.3.1 Liganden des GlyRs | 6 |
| 1.3.2 Theoretische Grundlagen der Rezeptoraktivierung | 10 |
| 1.4 Ligandenbindung..... | 11 |
| 1.4.1 Bisherige Mutagenesestudien am GlyR..... | 12 |
| 1.4.2 Kristallstruktur des AChBP | 15 |
| 1.4.3 Neues Ligandenbindungsmodell der GlyR α 1-Untereinheit | 16 |
| 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit | 17 |
| 2. Material..... | 18 |
| 2.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien | 18 |
| 2.2 Bakterienstämme | 18 |
| 2.3 Plasmide | 18 |
| 2.4 Oligonukleotide | 19 |
| 2.4.1 Mutageneseprimer..... | 19 |
| 2.4.2 Sequenzierprimer | 20 |
| 2.4.3 Sonstige Oligonukleotide..... | 20 |
| 2.5 Enzyme | 20 |
| 2.5.1 Restriktionsendonukleasen | 20 |
| 2.5.2 Sonstige Enzyme..... | 21 |
| 2.6 Marker | 21 |
| 2.7 Antikörper | 21 |
| 2.8 Kits | 22 |
| 2.9 Puffer und Lösungen | 22 |
| 2.10 Radioaktivität | 24 |
| 2.11 Geräte | 25 |
| 3. Methoden | 26 |
| 3.1 Molekularbiologische Methoden..... | 26 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.1.1 | Herstellung elektrokompetenter Zellen..... | 26 |
| 3.1.2 | Transformation..... | 26 |
| 3.1.3 | Lagerung von Bakterienkulturen | 27 |
| 3.1.4 | Plasmidpräparationen mit Qiagen-Kits..... | 27 |
| 3.1.5 | Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren | 28 |
| 3.1.6 | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..... | 28 |
| 3.1.7 | Ligation von DNA-Fragmenten..... | 29 |
| 3.1.8 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen..... | 29 |
| 3.1.9 | Ethanol-fällung..... | 30 |
| 3.1.10 | Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion..... | 30 |
| 3.1.11 | PCR-Mutagenese | 31 |
| 3.1.12 | Restriktionsverdau von DNA..... | 33 |
| 3.1.13 | Sequenzierung (Sanger <i>et al.</i> 1977)..... | 33 |
| 3.1.14 | <i>in vitro</i> Transkription | 34 |
| 3.2 | Elektrophysiologische Methoden..... | 36 |
| 3.2.1 | Das <i>Xenopus laevis</i> Oozytenexpressionssystem..... | 36 |
| 3.2.2 | Haltung der Frösche..... | 37 |
| 3.2.3 | Oozytenentnahme | 37 |
| 3.2.4 | Präparation der Oozyten | 38 |
| 3.2.5 | Injektion der cRNA in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten..... | 38 |
| 3.2.6 | Ableitung im Spannungsklemmenmodus (Engl. voltage clamp) | 38 |
| 3.3 | Molekulares Modelling | 44 |
| 3.4 | Biochemische Methoden..... | 45 |
| 3.4.1 | Membranpräparation..... | 45 |
| 3.4.2 | SDS-Polyacrylgelelektrophorese | 45 |
| 3.4.3 | Western-Blotting und Immunodetektion | 46 |
| 3.4.4 | Metabolische Markierung und Aufreinigung von 6xHis-markierten Proteinen aus <i>Xenopus laevis</i> Oozyten | 47 |
| 3.4.5 | Glykosylierungsanalyse mit EndoH und PNGase F | 48 |
| 3.4.6 | „Blue native“ Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)..... | 48 |
| 4. | Ergebnisse..... | 50 |
| 4.1 | Ligandenbindung am homooligomeren $\alpha 1$ -GlyR..... | 51 |
| 4.1.1 | Bindung von Glycin an das $\alpha 1$ -Homooligomer | 51 |
| 4.1.2 | Bindung des partiellen Agonisten Taurin an die $\alpha 1$ -Untereinheit..... | 57 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.1.3 | Strychninbindung am homooligomeren $\alpha 1$ -GlyR | 60 |
| 4.1.4 | Modulation des homooligomeren GlyRs durch das Tropein MBN | 62 |
| 4.1.5 | Ligandenbindungsmodelle des $\alpha 1$ -GlyR | 66 |
| 4.2 | Ligandenbindung am heterooligomeren $\alpha 1\beta$ -GlyR | 69 |
| 4.2.1 | Expression der GlyR β -Untereinheit in <i>Xenopus</i> Oozyten | 69 |
| 4.2.2 | Rettung der Glycinaffinität nach Koexpression der $\alpha 1$ -Mutanten mit der Wildtyp β -Untereinheit | 71 |
| 4.2.3 | Partielle Rettung der Strychninaffinität | 72 |
| 4.2.4 | Glycinbindung am $\alpha 1\beta$ -Heterooligomer | 74 |
| 4.2.5 | Strychninbindung am heterooligomeren $\alpha 1\beta$ -GlyR | 76 |
| 4.2.6 | Modell der Ligandenbindung am $\alpha 1\beta$ -Heterooligomer | 77 |
| 4.3 | Stöchiometrie des heterooligomeren GlyRs | 79 |
| 4.3.1 | Klonierung einer Tandemuntereinheit | 80 |
| 4.3.2 | Expression einer Tandemuntereinheit | 81 |
| 5. | Diskussion | 85 |
| 5.1 | Ligandenbindung am GlyR | 85 |
| 5.2 | Ligandenbindung in der Superfamilie der nAChR | 87 |
| 5.3 | Aktivierungsmechanismus der nAChR | 90 |
| 5.4 | Möglicher Aktivierungsmechanismus am GlyR | 94 |
| 5.5 | Wirkungsmechanismus partieller Agonisten | 96 |
| 5.6 | Wirkungsmechanismus von kompetitiven Antagonisten | 98 |
| 5.7 | Neue Stöchiometrie des heterooligomeren GlyRs | 99 |
| 5.8 | Assemblierung der β -Untereinheit | 101 |
| 5.9 | Tandemuntereinheiten - Eine generelle Methode zur Stöchiometriebestimmung | 101 |
| 5.10 | Regulation der Assemblierung in der Superfamilie der nAChR | 102 |
| 5.11 | Fazit | 105 |
| 6. | Literatur | 106 |
| 7. | Anhang | 117 |
| 7.1 | Abbildungsverzeichnis | 117 |
| 7.2 | Tabellenverzeichnis | 118 |
| 7.3 | Abkürzungen | 119 |
| 7.4 | Lebenslauf | 121 |

| | | |
|-----|---------------------------|-----|
| 7.5 | Publikationsliste | 122 |
| 7.6 | Posterpräsentationen..... | 122 |

Zusammenfassung

Der Glycinrezeptor (GlyR) ist ein inhibitorischer Chloridkanal, der u.a. im Rückenmark, im Hirnstamm und in der Retina exprimiert wird und dort maßgeblich an der Prozessierung von motorischen und/oder sensorischen Signalen beteiligt ist. Als Mitglied der Superfamilie der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren ist der GlyR ein Pentamer, dessen Untereinheiten jeweils aus einer extrazellulären N-terminalen Domäne, vier Transmembranregionen und einer großen intrazellulären Schleife bestehen. Bislang wurden vier ligandenbindende α -Untereinheiten ($\alpha 1-4$) und eine für die synaptische Verankerung verantwortliche β -Untereinheit identifiziert. Die β -Untereinheit bildet im Gegensatz zu den α -Untereinheiten keine Homooligomere; sie ist nur in heterooligomeren GlyRs mit einer bisher angenommenen Stöchiometrie von $3\alpha:2\beta$ zu finden. Wie bei allen Mitgliedern der Superfamilie erfolgt die Ligandenbindung innerhalb der extrazellulären Domänen an der Kontaktstelle zwischen zwei benachbarten Untereinheiten.

Um den Mechanismus der Ligandenbindung am homo- und heterooligomeren GlyR in dieser Arbeit aufzuklären, wurden Modelle der N-terminalen Domänen der $\alpha 1$ - und β -Untereinheiten basierend auf der Kristallstruktur des Acetylcholin-Bindeproteins generiert. Zur Verifizierung der Rolle aller im Modell in der Bindungstasche lokalisierten Aminosäureseitenketten wurden diese durch zielgerichtete PCR-Mutagenese substituiert, anschließend die mutierten Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und elektrophysiologisch charakterisiert. So konnten die wichtigsten Seitenketten der $\alpha 1$ -Ligandenbindungstasche identifiziert werden, die an der Bindung der Agonisten Glycin und Taurin, des Antagonisten Strychnin und des Modulators 3α -(3'-Methoxybenzoyloxy)nortropan beteiligt sind. Die anschließende Untersuchung des heterooligomeren $\alpha 1\beta$ -GlyRs konnte zum ersten Mal eine direkte Beteiligung der β -Untereinheit an der Ligandenbindung aufzeigen, wobei die Stabilisierung der Liganden in der Bindungstasche mit den zur $\alpha 1$ -Untereinheit homologen Resten erfolgt. Zusätzlich ergab ein Vergleich der Affinitätsveränderungen nach Substitution homologer Reste in der $\alpha 1$ - und der β -Untereinheit Hinweise auf eine neue Stöchiometrie heterooligomerer GlyRs. Nur die Koexpression einer $\alpha 1\beta$ -Tandemuntereinheit mit der β -Untereinheit resultierte in einem Rezeptor mit den

gleichen pharmakologischen Eigenschaften wie der heterooligomere Wildtyp-GlyR. Dieses Ergebnis bestätigte die neue $2\alpha:3\beta$ Stöchiometrie heterooligomerer GlyRs.

Damit wurde in dieser Arbeit eine dominante Rolle der β -Untereinheit in heterooligomeren GlyRs aufgezeigt, welche für das Verständnis der synaptischen Verankerung und insbesondere der Pharmakologie des Rezeptors wichtig ist. Mit der neuen Stöchiometrie wurde gleichzeitig eine neue $\beta\beta$ -Kontaktstelle in heterooligomeren GlyRs identifiziert, die als Wirkungsort neuer Therapeutika genutzt werden könnte.

1. Einleitung

Die historischen Wurzeln der Neurobiologie liegen bereits mehrere tausend Jahre zurück. Vor ca. 2500 Jahren hat Hippocrates das menschliche Gehirn als das Zentrum der Empfindungen und Intelligenz betrachtet. Jedoch dauerte es eine lange Zeit, bis die Struktur und Funktion des Gehirns näher untersucht werden konnte. Galvani konnte mit den Untersuchungen am Froschnerv vor ca. 200 Jahren zeigen, dass elektrische Signale für die Funktion des Nervensystems essentiell sind. Jedoch ermöglichte erst die von Golgi entwickelte und von Ramon y Cajal angewendete histologische Färbemethode die Entdeckung der Grundelemente der Nervensystemstruktur. Diese Grundelemente sind stark verzweigte und mit einander verbundene Zellen, die Neuronen. Durch zahlreiche Untersuchungen ist heute bekannt, dass die Reizweiterleitung von Neuron zu Neuron in einer Richtung erfolgt und durch schnelle Änderungen des über der Membran anliegenden Potenzials ermöglicht wird. Die lokalen Potenzialänderungen entstehen durch das Öffnen und Schließen von membranständigen, spannungsabhängigen Ionenkanälen und durch die damit bedingten Ionenströme. Die Reizweiterleitung zwischen zwei Neuronen erfolgt an speziellen Kontaktstellen, den Synapsen, die entweder eine elektrische oder chemische Signalübertragung nutzen. An chemischen Synapsen werden an der Präsynapse Botenstoffe, die Neurotransmitter, freigesetzt, die nach Diffusion durch den synaptischen Spalt postsynaptisch ligandengesteuerte Ionenkanäle aktivieren. Je nach Ionenart, die in die Zelle ein- oder ausströmt, wird die Postsynapse der Nachbarzelle entweder depolarisiert, was als exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) bezeichnet wird, oder sie wird hyperpolarisiert, was als inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP) definiert ist. Im zentralen Nervensystem (ZNS), das sich in Gehirn und Rückenmark gliedert, ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter die Aminosäure Glutamat (Takeuchi, 1985), während die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin (Aprison, 1990) sind.

1.1 Ligandengesteuerte Ionenkanäle

Ligandengesteuerte Ionenkanäle ermöglichen die Signalübertragung an chemischen Synapsen. Diese ionotropen Rezeptoren sind oligomere Membranproteinkomplexe, die in hoher Zahl an der Postsynapse angereichert sind, aber auch extrasynaptisch lokalisiert sein können (Luscher und Keller, 2004). Nach Freisetzung des Neurotransmitters an der Präsynapse bindet dieser an den postsynaptisch lokalisierten Rezeptor, der mehrere Konformationsänderungen durchläuft, die in der Öffnung des Ionenkanals und somit in einem Ionenstrom über der Membran resultieren. Ligandengesteuerte Ionenkanäle können in insgesamt drei große Familien gegliedert werden: die ionotropen Glutamaterezeptoren (iGluR), die ionotropen Purinrezeptoren (P2XR) und in die Superfamilie der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR).

Mitglieder der iGluR-Familie sind exzitatorisch wirkende Ionenkanäle, die hauptsächlich im ZNS exprimiert werden (Dingledine et al., 1999). Zu dieser Familie gehören der N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor (NMDAR), der α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat Rezeptor (AMPA) sowie der Kainatrezeptor, die alle nach ihren spezifischen, synthetischen Liganden benannt sind. Bei allen Familienmitgliedern handelt es sich um tetramere Proteinkomplexe, die aus miteinander verwandten Untereinheiten gebildet werden (Dingledine et al., 1999). Jede Untereinheit besteht aus einer großen N-terminalen Domäne, die primär an der Modulation des Rezeptors beteiligt ist (Herin und Aizenman, 2004). Außerdem besitzt jede Untereinheit drei Transmembranregionen (M1, M3 und M4) sowie eine in die Membran eingebettete Schleife M2 (Abb. 1.1). Die Ligandenbindungstasche liegt jeweils in der extrazellulären Domäne der entsprechenden Untereinheit und wird aus der Kontaktstelle zwischen den als S1 und S2 bezeichneten Schleifen gebildet (Madden, 2002). Der Sequenzvergleich zwischen den iGluRs mit bakteriellen, periplasmatischen Aminosäurebindeproteinen, von denen die Struktur bereits identifiziert wurde (Oh et al., 1993), erlaubte die Generierung von Homologiemodellen (Laube et al., 1997). Diese Modelle schlugen mehrere geladene, polare, sowie aromatische Aminosäurereste als ligandenbindende Reste vor. Außerdem wurde das Venus-Fliegenfallen-Modell als genereller Ablauf der Rezeptoraktivierung vorgeschlagen. Durch Kristallisation der durch eine Linkerregion verbundenen S1 und S2 Domänen der GluR2-Untereinheit des

AMPA (Armstrong et al., 1998) sowie der NR1-Untereinheit des NMDAR (Furukawa und Gouaux, 2003) konnte das Venus-Fliegenfallen-Modell bestätigt werden, und die genauen Interaktionen der entsprechenden Agonisten und Antagonisten mit dem Rezeptor identifiziert werden.

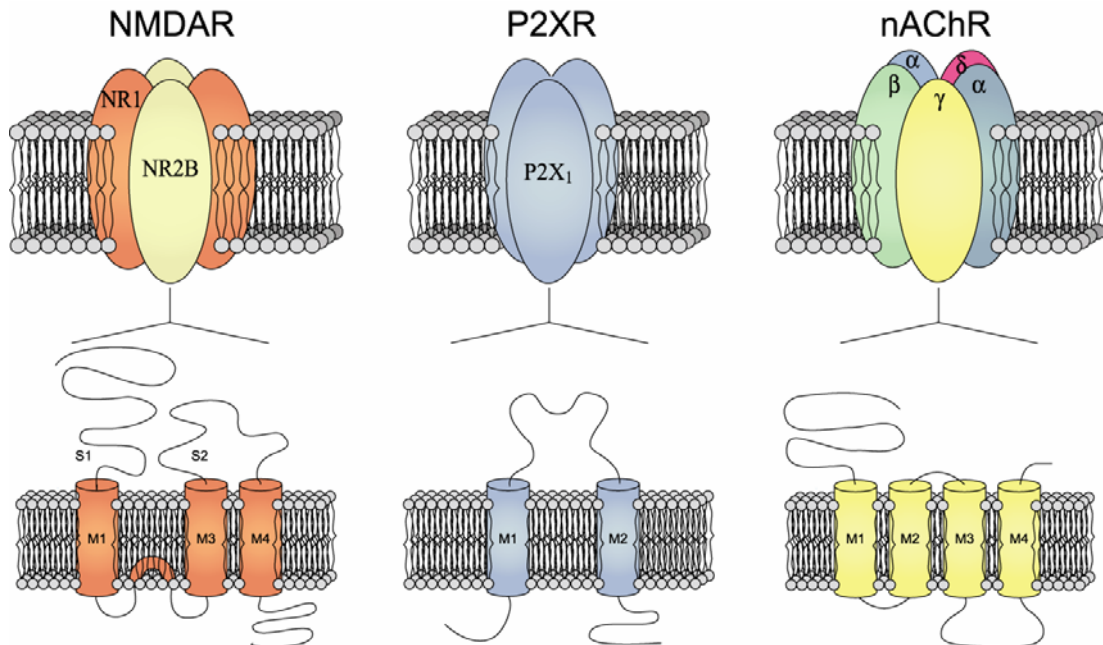


Abb. 1.1 Die drei Familien ligandengesteuerter Ionenkanäle. In dieser Darstellung sind der NMDAR als Vertreter der iGluR-Familie, der P2X₁ Rezeptor und der muskuläre nAChR als Vertreter der nAChR-Superfamilie dargestellt. Oben sind die Rezeptorkomplexe zur Illustration der Stöchiometrie, unten ist die Topologie der einzelnen Untereinheiten gezeigt.

Die Expression der P2X Rezeptoren, von denen bisher 7 Untereinheiten (P2X₁₋₇) identifiziert worden sind, erfolgt in nahezu allen Geweben (North, 2002). Diese durch ATP aktivierbaren und für Kationen permeablen, exzitatorischen Rezeptoren bestehen aus drei Untereinheiten (Nicke et al., 1998). Jede Untereinheit weist nur zwei Transmembrandomänen auf (Abb. 1.1), wobei die kurzen N- und C-Termini intrazellulär lokalisiert sind (Newbolt et al., 1998). In der großen extrazellulären Domäne findet die Ligandenbindung statt, jedoch ist immer noch unklar, ob diese innerhalb einer oder an der Kontaktstelle zwischen zwei benachbarten Untereinheiten erfolgt. Über die dreidimensionale Struktur der P2X-Rezeptoren ist wenig bekannt. Bisher wurden mehrere Versuche unternommen, um Modelle des P2X-Rezeptors basierend auf Mutagenesedaten (Vial et al., 2004) oder auf der niedrigen Homologie zur Klasse II Aminoacyl-tRNA Synthetasen zu erstellen (Yan et al., 2005). Mit Hilfe dieser Modelle konnten so einige geladene, polare und

aromatische Aminosäurereste identifiziert werden, die an der Ligandenbindung beteiligt sind.

Zu der Superfamilie der nAChR gehören die für Kationen durchlässigen, also exzitatorisch wirkenden, nAChR und die Serotoninrezeptoren (5HT₃) sowie die für Chloridionen durchlässigen, d.h. inhibitorisch wirkenden GABA_A bzw. GABA_c Rezeptoren, Glycinrezeptoren und der glutamatgesteuerte Chloridkanal aus *C. Elegans*. Alle diese Familienmitglieder sind pentamere Komplexe gebildet aus zu einander homologen Untereinheiten (Ortells und Lunt, 1995, Betz, 1990). Diese Untereinheiten können entweder Homo- oder Heteropentamere bilden. Jede Untereinheit besteht aus einer großen N-terminalen, extrazellulär lokalisierten Domäne, vier Transmembrandomänen (M1-M4) sowie einer großen intrazellulären Schleife zwischen Transmembrandomäne M3 und M4 (Abb. 1.1). Mitglieder dieser Familie werden auch als Cys-Loop-Rezeptoren bezeichnet, da sie alle in der N-terminalen Domäne eine durch zwei Cysteinreste gebildete Schleife besitzen (Corringer et al., 2000). Die Bindung des Liganden findet an der aus zwei benachbarten N-terminalen Domänen gebildeten Kontaktstelle statt (Arias, 2000). Die Verankerung des jeweiligen Rezeptorsubtyps an der Synapse wird durch die Wechselwirkung der intrazellulären M3M4-Schleife mit einem spezifischen intrazellulär lokalisierten Verankerungsprotein bewerkstelligt (Conroy et al., 2003, Meyer et al., 1995).

1.2 Der Glycinrezeptor

Der Glycinrezeptor (GlyR) ist ein inhibitorisch wirkender Chloridkanal, der hauptsächlich im Rückenmark, Hirnstamm und in der Retina exprimiert wird. Dort ist er an der Generierung des Motorrhythmus, der Koordination von Rückenmarksreflexen und der Prozessierung von sensorischen Eingängen beteiligt (Legendre, 2001). Durch Hydropathieanalysen konnte festgestellt werden, dass die typischen Strukturmerkmale der nAChR-Familie auch beim GlyR vorhanden sind (Abb. 1.2), d.h. jede Untereinheit besteht aus einer großen N-terminalen Domäne, vier Transmembranregionen und einer intrazellulären Schleife zwischen M3 und M4. Zusätzlich zu dem in der Superfamilie der nAChR konservierten Cysteinmotiv ist ein weiteres, nicht konserviertes vorhanden (Rajendra et al., 1995b). Des weiteren befindet sich in der N-terminalen Domäne mindestens eine Glykosylierungsstelle

weiter erhöht (Kumar et al., 2002, Nikolic et al., 1998, Kuhse et al., 1991, Malosio et al., 1991a). Nach heterologer Expression sind die α -Untereinheiten in der Lage homooligomere Rezeptoren zu bilden, die β -Untereinheit wird hingegen nur in heterooligomeren GlyRs gefunden (Kuhse et al., 1995, Kuhse et al., 1993, Grenningloh et al., 1990a). *In vivo* werden die α -Untereinheiten in ihrer Expression entwicklungs- und gewebespezifisch reguliert (Harvey et al., 2004, Malosio et al., 1991b, Becker et al., 1988). So werden in frühen Entwicklungsstadien hauptsächlich homooligomere $\alpha 2$ -GlyRs gefunden (Becker et al., 1988), die im adulten Stadium extrasynaptisch lokalisiert sind (Singer und Berger, 2000, Takahashi et al., 1992). Die β -Untereinheit wird dagegen ubiquitär exprimiert und ist in allen Entwicklungsstadien zu finden (Fujita et al., 1991, Malosio et al., 1991b). Sie bildet mit der $\alpha 1$ -Untereinheit die adulte Form des Rezeptors und ermöglicht die synaptische Verankerung durch die Wechselwirkung mit dem intrazellulären Verankerungsprotein Gephyrin (Meyer et al., 1995).

Bereits 1988 haben Langosch und Kollegen die Stöchiometrie des heterooligomeren GlyRs bestimmt, indem der Rezeptor zunächst mittels Affinitätschromatographie aus Rückenmark gereinigt und durch Kombination von densitometrischen mit Vernetzungsmethoden (Crosslinking) die Stöchiometrie von $3\alpha 1:2\beta$ des heterooligomeren GlyR bestimmt wurde. Auch die Untersuchung von Burzomato und Kollegen unterstützte die bisher angenommene Stöchiometrie der heterooligomeren GlyRs von $3\alpha 1:2\beta$ (Burzomato et al., 2003). In dieser Untersuchung wurde die Affinitätszunahme bedingt durch die Mutation eines in der ganzen Superfamilie der nAChR konservierten Leucins zum Threonin innerhalb der Transmembrandomäne M2 der $\alpha 1$ - und der β -Untereinheit verglichen. Dabei hatte die Substitution in der $\alpha 1$ -Untereinheit eine höhere Affinitätszunahme zur Folge als in der β -Untereinheit.

1.3 Pharmakologie des GlyRs

1.3.1 Liganden des GlyRs

Die Liganden eines ligandengesteuerten Ionenkanals können in Agonisten, partielle Agonisten, Antagonisten und Kanalblocker eingeteilt werden. Neben den Liganden gibt es noch mehrere Modulatoren, welche die Affinität von Liganden beeinflussen.

Ein Agonist besitzt sowohl Affinität als auch intrinsische Aktivität zum Rezeptor, d.h. die Bindung wird als Affinität und die Induktion der schnellen Kanalöffnung als intrinsische Aktivität definiert. Die durch die Ligandenbindung induzierte Kanalöffnung wird durch allosterische Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten erklärt, bei denen der Rezeptor mehrere Konformationsänderungen durchläuft (Changeux und Edelstein, 1998). Partielle Agonisten können in Gegenwart von vollen Agonisten deren Wirkung inhibieren. In Abwesenheit des vollen Agonisten zeigen sie einen meist abgeschwächt aktivierenden Effekt (Colquhoun, 1998).

1.3.1.1 Agonisten

Als voller Agonist des Glycinrezeptors wirkt die Aminosäure Glycin (Abb.1.3). Neben Glycin haben auch andere Aminosäuren einen aktivierenden Effekt auf den Glycinrezeptor und zwar in folgender Reihenfolge der Affinität: β -Alanin > Taurin >> DL- β -Aminoisobutyrate > L- α -Alanin > L-Serin >> GABA. Interessanterweise hängt es aber vom Expressionssystem ab, in wie weit manche Liganden als volle oder als partielle Agonisten am GlyR wirken. Nach Expression des Rezeptors in HEK293-Zellen agieren Glycin, β -Alanin und Taurin als volle Agonisten (Lynch et al., 1997, Bormann et al., 1993), während sich nach Expression des GlyRs in *Xenopus laevis* Oozyten β -Alanin und Taurin als partielle Agonisten verhalten (De Saint Jan et al., 2001).

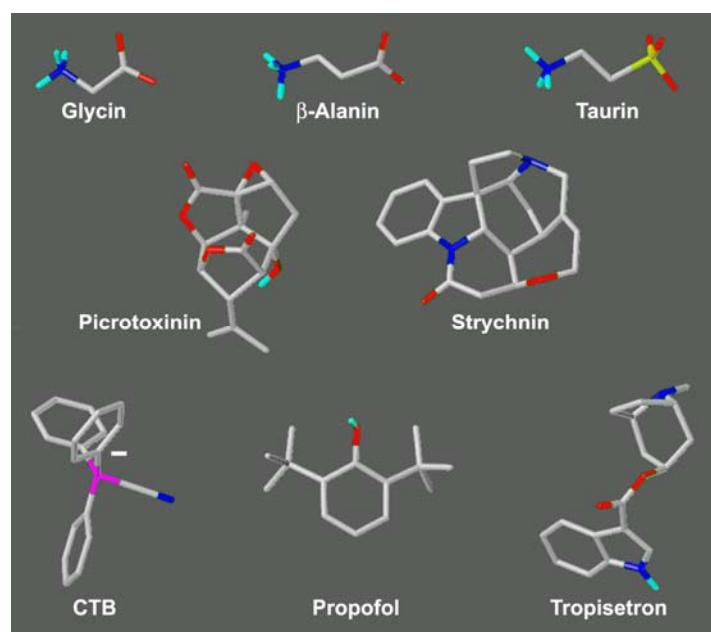


Abb. 1.3 Liganden des GlyRs. Im oberen Abschnitt sind neben dem vollen Agonisten Glycin die partiellen Agonisten β -Alanin und Taurin dargestellt. Im mittleren Abschnitt sind die Antagonisten

Strychnin und Picrotoxinin, und im unteren Abschnitt der Kanalblocker CTB sowie die Modulatoren Propofol und Tropisetron abgebildet (verändert nach Laube et al. (2002), Trends Pharmacol Sci., 23, 519-527).

1.3.1.2 Antagonisten

Im Gegensatz zum Agonisten kann ein Antagonist zwar an den Rezeptor binden, doch hieraus resultiert keine Kanalöffnung, d.h. der Antagonist besitzt Affinität zum, aber keine intrinsische Aktivität am Rezeptor. Antagonisten binden reversibel an den Rezeptor, und kompetitive Antagonisten konkurrieren mit dem Agonisten um die gleiche Bindungsstelle. Das Alkaloid Strychnin ist ein kompetitiver Antagonist des GlyRs (Young und Snyder, 1974) und wird aus dem Baum *Strychnos nux vomica* isoliert. Es weist eine hohe Selektivität und eine höhere Affinität ($K_D \approx 10$ nM) als Glycin zum Rezeptor auf. Aminostrychnin-Agarosesäulen wurden zur Aufreinigung des GlyRs benutzt (Pfeiffer et al., 1982), und [^3H]-Strychnin wird als selektiver Radioligand für diesen Rezeptor verwendet.

1.3.1.3 Kanalblocker

Kanalblocker haben einen antagonistischen Charakter und induzieren nach Bindung an den Rezeptor keine Kanalöffnung. Cyanotriphenylborat (CTB) ist die einzige bisher bekannte Substanz, die als Kanalblocker am GlyR wirkt (Rundstrom et al., 1994). CTB blockiert bevorzugt die $\alpha 1$ -Homooligomere sowie alle Heterooligomere, nicht aber $\alpha 2$ -Homooligomere. Deshalb kann es zur Unterscheidung verschiedener GlyR-Isoformen eingesetzt werden.

Ein weiterer Inhibitor ist das Pflanzenalkaloid Picrotoxin, das aus äquimolaren Mengen von Picrotin und Picrotoxinin besteht. Beide Substanzen unterscheiden sich lediglich durch eine bei Picrotoxinin vorhandene Isoprenylgruppe, die bei Picrotin zusätzlich mit einer Hydroxylgruppe substituiert ist. Picrotoxinin wurde zunächst als nichtkompetitiver Antagonist des GABA_A-Rezeptors identifiziert, während Picrotin pharmakologisch bei diesem Rezeptor inaktiv ist. Am GlyR sind jedoch beide Substanzen im gleichen Maße wirksam (Lynch et al., 1995). Der Wirkmechanismus von Picrotoxinin ist bislang umstritten. Zum einen wurde zunächst vorgeschlagen, dass Picrotoxin ein Kanalblocker ist (Pribilla et al., 1992, Akaike et al., 1985). Zum anderen wurde aber in der Arbeit von Lynch und Kollegen (1995) ein kompetitiver Antagonismus gefunden, d.h. mit zunehmender Agonistenkonzentration nahm die

Inhibition ab (Lynch et al., 1995). Je nach Untereinheitenzusammensetzung des GlyRs weist Picrotoxinin eine unterschiedliche Sensitivität auf. So werden homooligomere α -Rezeptoren bereits durch 100 μ M Picrotoxinin stark gehemmt, während heterooligomere $\alpha 1\beta$ -GlyRs erst nach Applikation hoher Picrotoxininkonzentrationen (1 mM) eine Hemmung aufzeigen (Handford et al., 1996, Pribilla et al., 1992). Für die Wirkung von Picrotoxin wurde gezeigt, dass Reste in der Transmembrandomäne M2 essentiell sind, was gegen einen kompetitiven Antagonismus und mehr für einen Kanalblock spricht. So scheint der aus den Threoninresten ($\alpha 1$ T258) gebildete Ring im α -Pentamer für die Wirkung von Picrotoxin verantwortlich zu sein. Diese Aminosäure entspricht dem $\alpha 1$ F282 in der β -Untereinheit, und nach Einführung eines Threonins an dieser Position kann die hohe Picrotoxinsensitivität wiederhergestellt werden (Shan et al., 2001).

1.3.1.4 Modulatoren

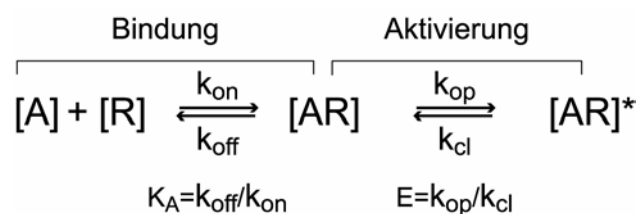
Zu den Modulatoren des GlyRs zählen Zink, Ethanol und einige Anästhetika wie z.B. Propofol (Lynch, 2004). Zink hat in geringen Konzentrationen (0,2 - 10 μ M) einen potenzierenden Effekt auf die Glycinaffinität (Laube et al., 1995, Bloomenthal et al., 1994), während es in hohen Konzentrationen (> 100 μ M) die Affinität reduziert. Auch hohe Ethanolkonzentrationen (50 mM) zeigen einen potenzierenden Effekt auf glycininduzierte Ströme (Celentano et al., 1988). Die Wirksamkeit von n-Alkoholen steigt mit ihrer Länge, d.h. sie erreicht ein Maximum bei 10-12-Kohlenstoffatomen und nimmt danach drastisch ab (Mascia et al., 1996). Das Anästhetikum Propofol erhöht die Agonistenaffinität und steigert die Aktivierungseffizienz partieller Agonisten, so dass diese zu vollen Agonisten werden (O'Shea et al., 2004).

Zu weiteren Modulatoren des GlyRs gehören auch die Tropeine, die zunächst als Antagonisten des Serotoninrezeptors 5HT₃ bekannt waren. Tropeine sind Ester des 3 α -Hydroxytropans und Amide des 3 α -Aminotropans. Zu ihnen gehören das Tropisetron, LY-278,584, Zatosetron, Bemisetron und das 3 α -(3'-Methoxybenzoyloxy)nortropan (MBN). Eine Studie über verschiedene Substitutionen von Tropeinen zeigte, dass das MBN die höchste Affinität für den GlyR besitzt (Maksay et al., 2004). Bei geringen Agonisten und Tropeinkonzentrationen sind Tropeine in der Lage den GlyR zu potenzieren,

während sie bei hohen Konzentrationen inhibierend wirken (Biro und Maksay, 2004, Chesnoy-Marchais et al., 2000, Maksay et al., 1999, Chesnoy-Marchais, 1996). Interessanterweise scheint die potenzierende Wirkung sich additiv zu der Potenzierung durch die Modulatoren Zink, Ethanol und Propofol zu verhalten, was auf einen neuen Wirkmechanismus schließen lässt (Chesnoy-Marchais, 1999). Des weiteren wurde gezeigt, dass die Potenzierung von Tropisetron nur bei $\alpha 1$ -, $\alpha 1\beta$ - sowie $\alpha 2\beta$ - und nicht bei $\alpha 2$ -GlyRs vorhanden ist (Supplisson und Chesnoy-Marchais, 2000), während die Inhibierung bei der $\alpha 2$ -Untereinheit im Vergleich zur $\alpha 1$ -Untereinheit 2-fach stärker ausgeprägt ist (Maksay et al., 1999). Bislang ist weder bekannt, ob die potenzierende und inhibierende Wirkung über die Bindung an eine oder zwei separate Bindungstaschen vermittelt wird und wo sich diese befinden.

1.3.2 Theoretische Grundlagen der Rezeptoraktivierung

Die Wirkung von Agonisten an ligandengesteuerten Ionenkanälen setzt sich aus zwei Teilprozessen zusammen: der Bindung des Agonisten an den Rezeptor folgt die Kanalaktivierung. Beide Prozesse sind miteinander gekoppelt und können mit folgendem Aktivierungsmodell veranschaulicht werden (Del Castillo, 1957).



Gleichung 1.1

Nach diesem vereinfachten Modell reagiert ein Agonist [A] mit einem Rezeptor [R] zu einem zunächst geschlossenen Rezeptor-Agonistenkomplex [AR], der dann in die offene Form [AR]^{*} übergeht. Der erste Schritt dieser Reaktion wird als Bindung mit der Gleichgewichtskonstanten K_A und den Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} bezeichnet und der zweite als Aktivierung („Gating“) mit der Gleichgewichtskonstanten E und den Geschwindigkeitskonstanten k_{op} und k_{cl} . Die Aktivierung resultiert beim GlyR in der Kanalöffnung und damit in einem Stromfluss über der Membran. Um die Funktion eines Rezeptors zu verstehen, ist es wichtig herauszufinden, welche Aminosäurereste an der Bindung des Liganden und welche an der Kanalaktivierung beteiligt sind. Nach Einführung von Mutationen in einen Rezeptor werden i.d.R. die EC_{50} -Werte, also die Agonistenkonzentrationen, die den halbmaximalen Stromfluss bedingen, zwischen Wildtyp und Mutante verglichen.

Änderungen im Aktivierungs- und Bindungsgleichgewicht wirken sich aber beide auf den EC_{50} -Wert aus, d.h. bei einer Veränderung des EC_{50} -Wertes muss nicht zwingendermaßen die Affinität des Liganden zum Rezeptor verändert sein.

$$EC_{50} = K_A / (1 + E) \quad \text{Gleichung 1.2}$$

Zur genauen Charakterisierung einer Mutation müssen eigentlich aufwendige kinetische Untersuchungen zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten beider Reaktionen durchgeführt werden. Nach Colquhoun (1998) können durch Mutationen bedingte Änderungen im Aktivierungsprozess aber auch aufgrund der Verminderung des induzierten Maximalstromes I_{\max} identifiziert werden (Colquhoun, 1998), denn für die maximale Offenwahrscheinlichkeit, die dem Maximalstrom entspricht, gilt:

$$p_{\max} = E / (1 + E) \quad \text{Gleichung 1.3}$$

Änderungen im Maximalstrom können aber auch aufgrund von Expressionsschwankungen entstehen, d.h. Änderungen im Aktivierungsvorgang können oft nicht detektiert werden, da die Stromantworten i.d.R. um den Faktor 2-3 schwanken. Außerdem ist der Vergleich der Stromantworten bei Verwendung des vollen Agonisten schwierig, da diese oft eine hohe intrinsische Aktivität (E) besitzen und der Rezeptor damit eine hohe Offenwahrscheinlichkeit hat (Colquhoun, 1998). Deshalb werden für diese Untersuchungen Agonisten mit niedriger intrinsischer Aktivität ($E < 10$), i.d.R. partielle Agonisten, verwendet, da dort auch kleine Änderungen im Aktivierungsgleichgewicht E eine größere Änderung des Maximalstromes zur Folge haben (vgl. Gleichung 1.3). Um Expressionsschwankungen zu berücksichtigen, werden deshalb nicht die absoluten Maximalströme gegenübergestellt, sondern die Aktivierungseffizienz des partiellen Agonisten im Vergleich zum vollen Agonisten. Durch den Vergleich der Aktivierungseffizienzen können also Hinweise erlangt werden, ob ein Rest an der Ligandenbindung oder Kanalaktivierung beteiligt ist. Eine genaue Charakterisierung kann aber nur mittels Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten erfolgen.

1.4 Ligandenbindung

Da es sich bei den ligandengesteuerten Ionenkanälen um membranständige Proteine handelt, ist die Kristallisation zur Strukturermittlung schwierig. Auch die Bestimmung der Struktur mittels NMR ist aufgrund der Größe der einzelnen Untereinheiten und deren Verankerung in der Membran bisher kaum möglich.

Soweit wurden zur Identifizierung von an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäureresten bei der nAChR-Superfamilie folgende Strategien verfolgt. Mehrere Mutageneseexperimente und die anschließende elektrophysiologische Charakterisierung ermöglichten die Identifizierung von Aminosäureresten, die die Affinität der Agonisten und/oder Antagonisten verändern. Die Proteinabschnitte, die die Ligandenaffinität bei Mitgliedern der nAChR-Superfamilie verändern wurden als A-, B-, C-, D-, E- und F-Schleifen definiert, ohne in Zusammenhang mit Sekundärstrukturelementen zu stehen (Corringer et al., 2000). Andererseits wurde versucht, die Struktur definierter Untereinheitenabschnitte über Sequenzhomologien zu ermitteln, d.h. basierend auf der Homologie zu Proteinen, deren Struktur bereits aufgeklärt wurde, wurden Ligandenbindungsmodelle erstellt. So wurde u.a. die Struktur der N-terminalen Domäne der $\alpha 1$ -Untereinheit an die Struktur des Biotinrepressors angepasst (Gready et al., 1997). Das so erhaltene Modell der N-terminalen Domäne der $\alpha 1$ -Untereinheit ließ sich jedoch nicht mit den Ergebnissen der Mutageneseexperimente vereinbaren.

1.4.1 Bisherige Mutagenesestudien am GlyR

Frühere Mutagenesestudien an der $\alpha 1$ -Untereinheit des GlyR haben mehrere Aminosäurereste identifiziert, deren Substitution die Affinität für den Agonisten und/oder Antagonisten z.T. stark reduziert. Jedoch konnte aufgrund fehlender Strukturdaten nicht festgestellt werden, ob diese Affinitätsreduktionen durch direkte oder indirekte Effekte auf die Bindung des Liganden bedingt sind. Beispielsweise konnte nach Vergleich der Sequenzen und der pharmakologischen Eigenschaften der verschiedenen Isoformen der α -Untereinheiten festgestellt werden, dass die reduzierte Glycinaffinität der sogenannten $\alpha 2^*$ -Variante der $\alpha 2$ -Untereinheit im Vergleich zur normalen $\alpha 2$ -Untereinheit auf einen einzigen Austausch in der N-terminalen Domäne ($\alpha 2^*G167E$) zurückzuführen ist. Nach Substitution des Glutamats durch Glycin in der $\alpha 2^*$ -Untereinheit wurde die Affinität ähnlich der des $\alpha 2$ -Wildtyps wiederhergestellt (Kuhse et al., 1990a). Auch der Austausch des homologen $\alpha 1$ -Restes $\alpha 1G160$ durch Glutamat ($\alpha 1G160E$) resultierte ebenfalls in einem Affinitätsverlust (Vandenberg et al., 1992a). Weitere Mutageneseexperimente zeigten, dass auch die benachbarten Aminosäurereste $\alpha 1F159$ und $\alpha 1Y161$ in der B-Schleife die Ligandenaffinitäten beeinflussen (Schmieden et al., 1993). Während die

Substitution $\alpha 1Y161A$ in einem strychnininsensitiven Kanal resultierte, blieb beim Austausch $\alpha 1Y161F$ die Affinität erhalten. Mit dem Doppelaustausch $\alpha 1F159Y/Y161F$ wurde sogar ein Kanal generiert, der höhere Glycin-, β -Alanin- und Taurinaffinitäten als der Wildtyp aufzeigte (Schmieden et al., 1993), ohne Veränderung der Strychninaffinität.

Mit gleichem Ansatz wurde gezeigt, dass beim GlyR eine weitere, in der Superfamilie der nAChR nicht konservierte Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen $\alpha 1C198$ und $\alpha 1C209$ vorhanden sein muss, die als C-Schleife bezeichnet wird. Während die Substitution $\alpha 1C209S$ zu einem Rezeptor führte, der zwar assemblieren kann, aber nicht funktionell war, verhinderte die Mutation des zweiten Cysteins $\alpha 1C198$ die Assemblierung des Rezeptors (Rajendra et al., 1995b). Der Austausch weiterer Aminosäurereste ($\alpha 1K200$, $\alpha 1Y202$ und $\alpha 1T204$), die sich innerhalb der C-Schleife befinden, führte zum Affinitätsverlust des Agonisten und/oder des Antagonisten (Rajendra et al., 1995b, Vandenberg et al., 1992a). So konnte gezeigt werden, dass für die Bindung von Glycin nicht der aromatische Charakter des $\alpha 1Y202$ von Bedeutung ist, denn die verwendete $\alpha 1Y202F$ Mutation zeigte die gleiche Reduktion der Glycinaffinität wie die $\alpha 1Y202L$ Substitution (Rajendra et al., 1995b). Während die Substitution von $\alpha 1K200$ die Glycin- und Strychninaffinität reduziert (Rajendra et al., 1995a, Rajendra et al., 1995b, Vandenberg et al., 1992a), ist $\alpha 1T204$ für die Erhaltung der apparenten Glycinaffinität sehr wichtig (Vandenberg et al., 1992b).

Durch zielgerichtete Mutagenese wurden durchgehend die Reste der A-Schleife zwischen $\alpha 1I93$ und $\alpha 1K104$ zu Alanin ausgetauscht, jedoch führte nur die Substitution der Reste $\alpha 1W94A$, $\alpha 1A101H$ und $\alpha 1N102A$ zu einer Reduktion der apparenten Glycinaffinität, während die Strychninaffinität nicht stark verändert war (Vafa et al., 1999). Weiterhin wurden in der Untersuchung von Laube et al. insgesamt 17 Mutationen der $\alpha 1$ -Untereinheit charakterisiert, jedoch resultierten nur die zwei Substitutionen $\alpha 1E157A$ und $\alpha 1D165A$ in einem nicht funktionellen Rezeptor (Laube et al., 2000). Zusätzlich wurden weitere Reste der $\alpha 1$ -Untereinheit, wie das $\alpha 1A52$ und $\alpha 1D148$ identifiziert, deren Mutation sowohl die Glycinaffinität als auch die Kanalaktivierung verändert (Schofield et al., 2003, Rajendra et al., 1994,

Ryan et al., 1994). Außerdem wurden mehrere Reste ($\alpha 1K104$, $\alpha 1F108$, $\alpha 1I111$, $\alpha 1T112$ und $\alpha 1A212$) identifiziert, die nicht die Affinität des vollen, sondern nur des partiellen Agonisten reduzieren (Schmieden et al., 1999 und 1992). So zeigten die Mutationen $\alpha 1I111A$ und $\alpha 1A212V$ eine reduzierte Taurinaktivierungseffizienz (Schmieden et al., 1992), während die Substitution von $\alpha 1K104$, $\alpha 1F108$ und $\alpha 1T112$ die Aktivierungseffizienz von Taurin und den IC_{50} -Wert von Strychnin erhöhte (Schmieden et al., 1999). Aus diesen Experimenten wurde zum einen geschlossen, dass es unterschiedliche Bindungsstellen für den vollen und den partiellen Agonisten gibt (Schmieden und Betz, 1995, Schmieden et al., 1992). Zum anderen wurde gefolgert, dass für die Bindung des Agonisten und Antagonisten überlappende Bindungsstellen existieren. Wie bereits eingangs erwähnt, konnte aber in keiner dieser zahlreichen Untersuchung festgestellt werden, ob und in welcher Form die mutierten Aminosäureseitenketten an der Bindung der Liganden beteiligt sind.

Im Gegensatz zur $\alpha 1$ -Untereinheit beschäftigten sich bisher nur wenige Untersuchungen mit der Rolle der β -Untereinheit in der Ligandenbindung. Homo- und heterooligomere Rezeptoren unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer Affinität für die Liganden Glycin und Strychnin. Lediglich bei der Einzelkanalleitfähigkeit gibt es Unterschiede. So haben α -Homooligomere eine etwa doppelt so hohe Leitfähigkeit, wie heterooligomere Glycinrezeptoren (Bormann et al., 1993). Aufgrund der angenommenen Stöchiometrie von $3\alpha:2\beta$ wurde deshalb den α -Untereinheiten eine dominante Rolle in der Ligandenbindung zugesprochen. Zusätzlich zeigten Photoaffinitätsmarkierungsexperimente mit dem radioaktiv markierten Antagonisten Strychnin, dass der photoaktive Antagonist immer in die α - und nie in die β -Untereinheit eingebaut wurde (Graham et al., 1983). Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass die α -Untereinheiten die ligandenbindenden Polypeptide des heterooligomeren GlyRs sind, während die β -Untereinheit für die Verankerung an der Synapse durch die Wechselwirkung mit dem Protein Gephyrin verantwortlich ist. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Punktmutation $\beta G229E$ in einem 3,4-fachen Affinitätsverlust des Agonisten Glycin resultiert (Rees et al., 2002). Jedoch war unklar, ob dieser Affinitätsverlust auf eine direkte Beteiligung an

der Ligandenbindung zurückzuführen ist, oder ob es sich dabei nur um einen allosterischen Effekt handelt.

1.4.2 Kristallstruktur des AChBP

Das Acetylcholin-Bindeprotein (AChBP) ist ein lösliches Protein, das in Gliazellen der Schnecke *Lymnaea stagnalis* produziert und in Abhängigkeit vom Acetylcholin in den synaptischen Spalt freigesetzt wird, wo es die synaptische Übertragung moduliert. Das Protein besteht aus 210 Aminosäuren, bildet ein Homopentamer (Abb. 1.4A) und hat Homologie zur N-terminalen Domäne der Mitglieder der nAChR-Superfamilie, wobei die Verwandtschaft mit den α -Untereinheiten des nAChR am größten ist (24% Sequenzidentität). Die Kristallisierung dieses Proteins erfolgte zunächst ohne Liganden, aber in der Bindungsstelle war das zum Acetylcholin strukturähnliche Puffermolekül HEPES gebunden (Brejc et al., 2001). Dadurch konnten erste Hinweise auf die Bindung des Liganden gewonnen werden, doch aufgrund der geringen Besetzungsdichte konnte die genaue Orientierung des HEPES-Moleküls und damit seine exakten Interaktionen mit der Bindungstasche nicht identifiziert werden.

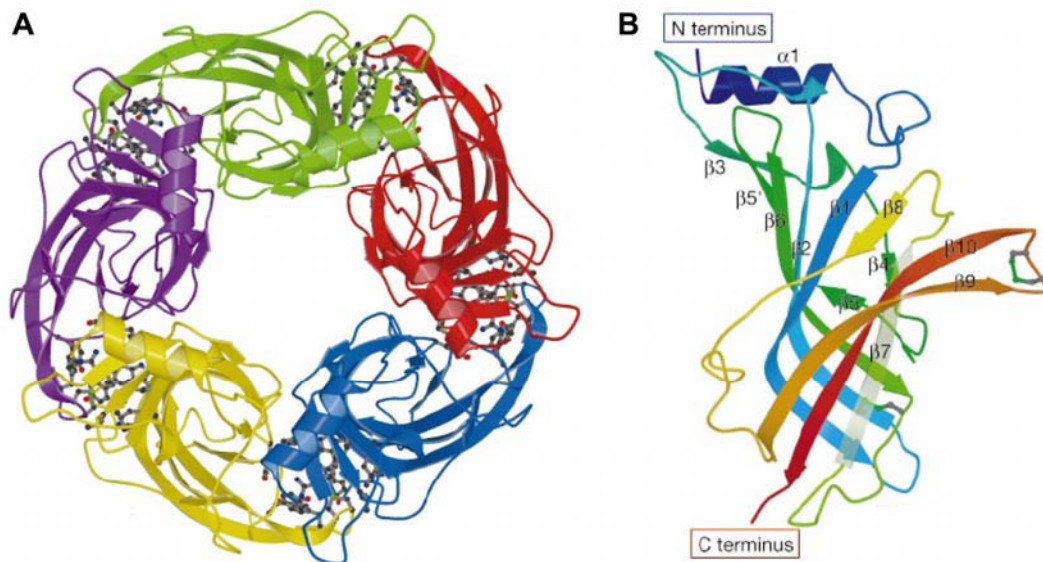


Abb. 1.4 Kristallstruktur des AChBP. A. Aufsicht auf das pentamere AChBP-Molekül. Jede Untereinheit ist farblich dargestellt. B. Seitenansicht auf eine AChBP-Untereinheit mit entsprechender Bezeichnung aller β -Faltblätter sowie der N-terminalen α -Helix. Jedes β -Faltblatt ist in einer anderen Farbe dargestellt (verändert nach Brejc et al. (2001), Nature, 411, 269-276).

Das AChBP-Monomer ist ein asymmetrisches Protein, das aus einer N-terminalen α -Helix, zwei kurzen 3_{10} -Helices und einer Kernregion aus 10 β -Faltblättern besteht,

die ein β -Sandwich formen (Abb. 1.4B). Die Ligandenbindungsstelle befindet sich jeweils an der Kontaktstelle zwischen zwei Untereinheiten. Sie wird aus mehreren Schleifen der einen Untereinheit (als (+)Seite der Kontaktstelle bezeichnet) und einer Reihe von β -Faltblättern der gegenüberliegenden Untereinheit (als (-)Seite definiert) gebildet.

1.4.3 Neues Ligandenbindungsmodell der GlyR α 1-Untereinheit

Wie bereits erwähnt, stellt die Generierung von Homologiemodellen basierend auf Kristallstrukturen eine Möglichkeit dar, putative Ligandenbindungs determinanten zu identifizieren. Da für den GlyR bisher keinerlei strukturelle Informationen vorliegen, wurde deshalb die Kristallstruktur des AChBP (Brejc et al., 2001) als Vorlage für die Erstellung eines neuen Ligandenbindungsmodells der N-terminalen Domäne der α 1-Untereinheit, basierend auf der Sequenzhomologie beider Proteine, verwendet.

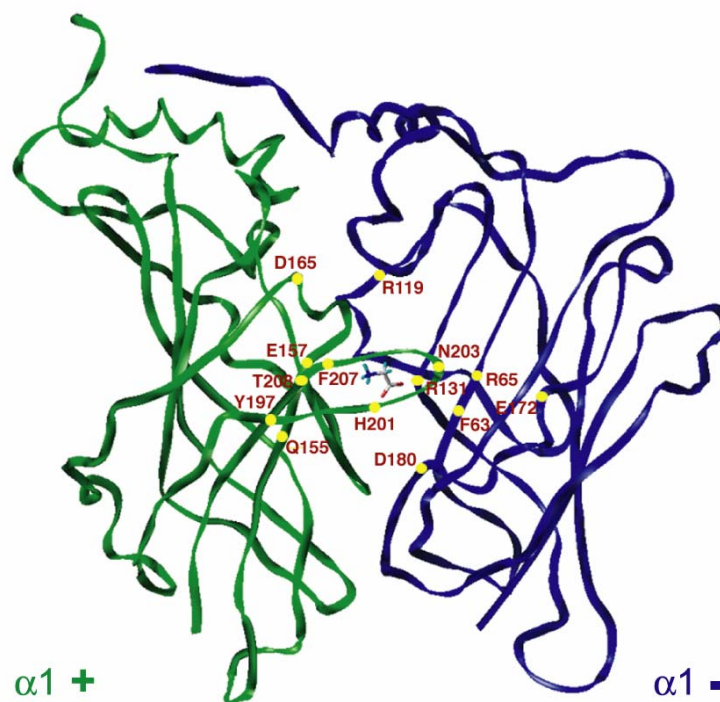


Abb. 1.5 Modell der N-terminalen Domäne der humanen GlyR α 1-Untereinheit. Seitenansicht eines α 1-Dimers. Die zwei Untereinheiten sind in blau und grün dargestellt. Der Ligand wird in der Mitte der Kontaktstelle gebunden. Aminosäurereste, die an der Ligandenbindung beteiligt sein könnten, sind mit gelben Punkten angedeutet.

In dem GlyR-Modell besteht jede Untereinheit, wie auch in der Ausgangsstruktur des AChBP, hauptsächlich aus β -Faltblättern, die durch Schleifenregionen miteinander verbunden sind. Nach Docking der Liganden in die Bindungstasche, die sich an der Kontaktstelle zwischen zwei benachbarten Untereinheiten befindet, wurden mehrere geladene, aromatische, sowie polare Aminosäurereste als mögliche Kandidaten für die direkte Interaktion mit dem jeweiligen Liganden vorgeschlagen (Abb. 1.5). Aufgrund der ungelösten Ligandenbindungs determinanten im AChBP und der geringen Sequenzhomologie (17%) zwischen dem AChBP und dem GlyR, war es jedoch nicht klar, ob die von der $\alpha 1$ -Modellstruktur vorgeschlagenen Reste tatsächlich an der Ligandenbindung beteiligt sind.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, möglichst alle Aminosäurereste zu identifizieren, die an der Agonisten- und Antagonistenbindung der $\alpha 1$ homo- und $\alpha 1\beta$ heterooligomeren GlyRs beteiligt sind. Basierend auf der Struktur des AChBP wurde ein Modell der N-terminalen Domäne der $\alpha 1$ -Untereinheit generiert, das mögliche Reste als Kandidaten der Ligandenbindung vorgeschlagen hat. In dieser Arbeit sollte die Rolle dieser Reste mittels PCR-Mutagenese und anschließender elektrophysiologischer Charakterisierung verifiziert werden. Speziell sollte die Rolle der β -Untereinheit in der Ligandenbindung, die in synaptischen GlyRs vorhanden ist, beleuchtet werden.

2. Material

2.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien wurden i.d.R. von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt) und Riedel-de-Haen (Seelze) bezogen. Verbrauchsmaterialien aus Plastik wurden von Eppendorf (Hamburg), Roth (Karlsruhe) und VWR (Darmstadt) bestellt. Steriles Operationsmaterialien stammt von B.Braun (Melsungen), während Elektrophysiologiezubehör von WPI (Berlin) verwendet wurde.

2.2 Bakterienstämme

- *Escherichia coli* XL1-Blue

Genotyp: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻*

F' [*proAB⁺ lacI^f lacZΔM15 Tn10(tet^r)*]

- Epicurian coli® XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*

F' [*proAB lacI^fΔM15 Tn10(tet^r)*]^c

2.3 Plasmide

Folgende Plasmide wurden von Prof. Günther Schmalzing, Technische Universität Aachen, erhalten:

- humane GlyR α 1-Untereinheit mit C-terminalen 6xHis-Tag im pNKS2# Vektor (α 1His)
- humane β -Untereinheit im pNKS4 Vektor
 1. ohne His-Tag (β),
 2. mit N-terminalem 6xHis-Tag (His β)

Folgende Plasmide wurden in dieser Arbeit kloniert:

- Tandemuntereinheit ($\alpha\beta$)_T im pNKS2#-Vektor

2.4 Oligonukleotide

2.4.1 Mutageneseprimer

Für die Einführung von Mutationen in die α 1- und β -Wildtypplasmide wurden folgende Primer der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) verwendet:

Tab. 2.1 Mutageneseprimer. Die Sequenz ist von 5' nach 3' angegeben.

| Bezeichnung | Sequenz | Austausch |
|-------------------|---|-----------|
| α 1E172As | CCTCATCTTTGAGTGGCAGG C ACAGGGAGCCGTGCAGG | GAA→GCA |
| α 1E172Aas | CCTGCACGGCTCCCTGT G CCTGCCACTCAAAGATCAG | TTC→TGC |
| α 1D180As | GCCGTGCAGGTAGCAG C AGGACTAACTCTGCCCC | GAT→GCA |
| α 1D180Aas | GGGGCAGAGTTAGTCCT T GCTGCTACCTGCACGGC | ATC→TGC |
| α 1N203As | CTGCACCAAGCACTAC G CAACAGGTAAATTCACC | AAC→GCA |
| α 1N203Aas | GGTGAATTTACCTGTT T GCGTAGTGCTTGGTGCAG | GTT→TGC |
| α 1K200As | GAGATACTGCACCG G CCACTACAACACAGG | TGT→GGC |
| α 1K200Aas | CCTGTGTTGTAGTG G CCGGTGCAGTATCTC | ACA→GCC |
| α 1Y202As | CTGCACCAAGCAC G GCAACACAGGTAAATTCACC | TAC→GGC |
| α 1Y202Aas | GGTGAATTTACCTGTGTT G CCGTGCTTGGTGCAG | GTA→GCC |
| β R86As | GAGTTAACATCTTCCT G GCACAAAAATGGAATGACCCC | AGA→GCA |
| β R86Aas | GGGGTCATTCCATTTTT T GTGCCAGGAAGATGTAACTC | TCT→TGC |
| β R154As | GTCCTTGTCAGCAT G GCGTTATCTATTACTC | AGG→GCG |
| β R154Aas | GAGTAATAGATAA C GCCATGCTGACAAGGAC | CCT→CGC |
| β E180As | GCAAGATGCAACT G GCGAGCTTTGGTTACA | GAG→GCG |
| β E180Aas | GTGTAACCAAAGCT C GCCAGTTGCATCTTGC | CTC→CGC |
| β K223As | GAATATGGTAACTGTACAG C ATACTATAAAGGC | AAA→GCA |
| β K223Aas | GCCTTTATAGTAT G GCTGTACAGTTACCATATCC | TTT→TGC |
| β Y225As | GTAAGTGTACAAAATAC G CTAAAGGCACGGGC | TAT→GCT |
| β Y225as | GCCCGTGCCTTTAG C GTATTTTGTACAGTTAC | ATA→AGC |
| β K226As | CTGTACAAAATACTAT G CAGGCACGGGCTAC | AAA→GCA |
| β K226Aas | GTAGCCCGTGCCT T GCATAGTATTTTGTACA | TTT→TGC |
| β Y231As | GGCACGGGCTAC G CCACATGCGTGGAAGTC | TAC→GCC |
| β Y231Aas | GACTTCCACGCATGT G GCGTAGCCCGTGCC | GTA→GGC |

2.4.2 Sequenzierprimer

Tab. 2.2 Sequenzierprimer. Alle aufgeführten Primer sind sense Primer (s).

| Bezeichnung | Sequenz (5'-3') | sequenzierte Konstrukte |
|--------------------|------------------------|--|
| h α 1-879s | CCCCATGGATGTCCAGACATG | α 1E172A; α 1D180A, α 1N203A, α 1K200A, α 1Y202A |
| h α 1-1552s | CTAAGTCCCCAGAGGAGATGCG | ($\alpha\beta$) _T |
| h β -203s | CCCGAGTACCTGCCAACTCC | β R86A |
| h β -396s | CCCCAGGCTGAAGCTCCCC | β R154A; β E180A |
| h β -643s | CGTTGCAAGATGCAACTGG | β K223A; β Y225A; β K226A; β Y231A |

2.4.3 Sonstige Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotidsequenz wurde zur Generierung eines Tandemkonstrukts (α 1 β)_T als 7-facher Alanin-Glycin-Serin -Linker (sense) benutzt:

GTGGGCACGGATGACGTCCACAACCAG(GCTGGAAGT)₇AAGGAAAAGTC
TTCACGGGTGGGCAC

2.5 Enzyme

2.5.1 Restriktionsendonukleasen

Tab. 2.3 Verwendete Restriktionsendonukleasen. Die Schnittstellen des Enzyms in der DNA-Sequenz sind durch Pfeile angedeutet.

| Restriktions- endonukleasen | Erkennungs- sequenz | Konzentration | Puffer | Bezugsquelle |
|--------------------------------|--|---------------|--------|--------------------------------|
| <i>NotI</i> | 5'GC↓GGCCGC3' 3'CGCCGG↑CG5' | 10U/ μ l | H | Roche Diagnostics, Mannheim |
| <i>SacI</i> | 5'GAGCT↓C3' 3'C↑TCGAG5' | 10U/ μ l | A | Roche Diagnostics, Mannheim |
| <i>HindIII</i> | 5'A↓AGCTT3' 3'TTCGA↑A5' | 10U/ μ l | B | Roche Diagnostics, Mannheim |
| <i>AatII</i> | 5'GACGT↓C3' 3'C↑TGCAG5' | 20U/ μ l | 4 | NEB, Frankfurt |
| <i>BbsI</i> | 5'GAAGAC(N) ₂ ↓3' 3'CTTCTG(N) ₆ ↑5' | 5U/ μ l | 2 | NEB, Frankfurt |

2.5.2 Sonstige Enzyme

Tab. 2.4 Verwendete Enzyme.

| Enzym | Konzentration | Bezugsquelle |
|---------------------------------|---------------|----------------------------|
| Sp6 RNA Polymerase | 50U/ μ l | Stratagene, Amsterdam (NL) |
| RNase A aus Rinderpankreas R500 | - | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Kollagenase Typ IIA | | Sigma-Aldrich, Steinheim |

2.6 Marker

DNA-Längenstandards

- Der 10 kb DNA-Längenstandard von Eurogentec (Seraing, Belgien) enthielt folgende Fragmente (in kb): 10; 8; 6; 5; 4; 3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2.
- Der 1 kb DNA-Marker von Eurogentec (Seraing, Belgien) bestand aus folgenden Fragmenten (in bp): 1000, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100.

Proteinstandards

- Für SDS-PAGE wurde der SeeBlue Plus2 Proteinstandard von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.
- Für BN-PAGE wurde der HMW Native Marker von Amersham Biosciences (Freiburg) benutzt.

2.7 Antikörper

- Primärantikörper: mAb 4a (1:500), mAb 2b (1:100), myc
- Sekundärantikörper: Anti-Maus HRP-gekoppelt (horse reddish peroxidase)

2.8 Kits

Tab. 2.5 Verwendete Kits.

| Kit | Bezugsquelle |
|--|------------------------------------|
| QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit | Stratagene, Amsterdam, Niederlande |
| mCAP™ RNA Capping Kit | Stratagene, Amsterdam, Niederlande |
| Qiagen Plasmid Kit (Maxi) | Qiagen, Hilden |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen, Hilden |
| Qiaquick Gel Extraction Kit | Qiagen Hilden |
| Ambion mMessage maschine | Ambion, Huntingdon, UK |
| Ligation Kit | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Super-Signal West Pico Chemi | |
| Luminescence Kit | Perbio GmbH, Bonn |
| BCA Protein Assay Reagent Kit | Perbio GmbH, Bonn |

2.9 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Lösungen in ddH₂O angesetzt.

Elektrophysiologie

| | |
|---------------------------------|---|
| Barth's Medium | 88 mM NaCl, 2,4 mM NaHCO ₃ , 1 mM KCl, 0,4 mM CaCl ₂ , 0,3 mM Ca(NO ₃) ₂ , 0,84 mM MgSO ₄ , 10 mM HEPES pH 7,2, Streptomycin/Penicillin 5000 U/ml |
| Ca ²⁺ -freier Ringer | 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ , 5 mM HEPES pH 7,2 |
| Ringer | 115 mM NaCl, 1,8 mM CaCl ₂ ; 1 mM KCl, 10 mM HEPES pH 7,2 |
| Glycinlösung | 300 mM in Ringer |
| ND96 1x | 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , 5 mM HEPES pH 7,2 |
| Strychninlösung | 1 mM in Ringer |
| Taurinlösung | 300 mM in Ringer |
| MBN-Lösung | 1 mM in Ringer |

Bakterienkultur

| | |
|------------|---|
| LB-Medium: | 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) Tryptone, 1% (w/v) NaCl |
|------------|---|

LB-Agar: 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) Tryptone, 1% (w/v) NaCl, 1,5% (w/v) Agar

SDS-PAGE

SDS Laufpuffer 1x 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
 SDS Probenpuffer 1x 63 mM Tris pH 6,8, 10% Glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol oder 100 mM DTT,
 Trenngelpuffer 1,5 M Tris pH 8,8
 Sammelgelpuffer 0,5 M Tris pH 6,8
 Acrylamid SDS-PAGE: 40%, (29:1) Acrylamid 38,67%, Bisacrylamid 1,33%,
 BN-PAGE: 30%, (37,5:1) Acrylamid 29,2% Bisacrylamid 0,78 %
 Coomassielösung 0,124% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 7% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) Ethanol
 Entfärbelösung 7% (v/v) Essigsäure
 Fixierlösung 10% (v/v) Essigsäure, 10% (v/v) Methanol

Westernblotting

Transferpuffer 39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol
 20x TBS 400 mM Tris/HCl pH 8,0, 2,74 M NaCl
 1x TBST 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 137 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween20
 Ponceau S 0,2% (w/v) Ponceau S, 3% (w/v) Trichloressigsäure
 Blockingpuffer 5% (w/v) Milchpulver in 1x TBST

BN-PAGE

Kathodenpuffer 50 mM Tricine, 15 mM Bistris, pH 7,0; vor Gebrauch auf 0,005% (w/v) Serva Blue G einstellen
 Anodenpuffer 50 mM Bistris pH 7,0
 Gelpuffer 3x 1,5 M 6-Aminocapronat, 150 mM Bistris, pH 7,0
 BN-Probenpuffer 5x 100 mM 6-Aminocapronat, 50% (v/v) Glycerol, 1% (w/v) Comassie G

Pufferlösungen für molekularbiologische Methoden

| | |
|--|---|
| Ampicillinstocklösung | 100 mg/ml in H ₂ O |
| Ethidiumbromid- stocklösung | 10 mg/ml in H ₂ O |
| TAE 50x | 242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) |
| TBE 10x | 108 g Tris, 15,5 ml Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) |
| TE | 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8,0) |
| Tetracyclinlösung | 12 mg/ml in Ethanol |
| Probenpuffer (Agarose- Gelelektrophorese 6x | 15% Ficoll 400, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylene Cyanol FF |

Puffer für Gewebe- und Zellpräparationen

Zu folgenden Lösungen wurde pro 50 ml Puffer eine Complete Mini Proteaseinhibitortablette (Roche, Mannheim) zugegeben.

| | |
|-------------------|--|
| Puffer A (HNE 1x) | 20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT(optional: Zugabe von 0,1% Triton X-100) |
| Puffer B | 25 mM KPi pH 7,4, 200 mM KCl |
| Puffer C | 25 mM KPi pH 7,4, 200 mM KCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT |
| Oocytenpuffer A | 0,1 M NaPi pH 8,0, 0,5% (w/v) n-Dodecyl-β-D-Maltosid (Calbiochem, Darmstadt) |
| Oozytenpuffer B | 0,1 M NaPi pH 8,0, 0,1% (w/v) n-Dodecyl-β-D-Maltosid |
| Oozytenpuffer C | 0,1 M NaPi pH 8,0, 0,1% (w/v) n-Dodecyl-β-D-Maltosid, 25 mM Imidazol |
| Elutionspuffer | 20 mM Tris pH 7,4, 0,1% (w/v) n-Dodecyl-β-D-Maltosid, 10 mM EDTA, 250 mM Imidazol |

2.10 Radioaktivität

- [³⁵S]Methionin, Hartmann Analytik (Braunschweig) und Amersham Biosciences (Freiburg)

2.11 Geräte

Tab. 2.6 Benutzte Geräte.

| Gerät | Hersteller |
|--|---------------------------------------|
| Analysenwaage A120S | Sartorius, Göttingen |
| Autoklav Vaculab S3000 | MMM GmbH, München |
| Binokular Leica Wild M3Z | Leica, Wetzlar |
| Gene Power Supply GPS 200/400 | Pharmacia |
| Gene Pulser | Bio Rad, München |
| GeneAmp PCR System 9700 | Applied Biosystems |
| Inkubator Typ BE800 | Memmert |
| Magnetrührer IKAMAG REO | IKA-Labortechnik, Staufen |
| Mikromanipulator MD4 | Bachofer, Reutlingen |
| Mikroschmiede MF-83 | Bachofer, Reutlingen |
| Mixer 5432 | Eppendorf, Hamburg |
| Oszilloskop HM 408 | Hameg |
| pH-Meter Beckmann Phi 32 | Beckmann Instruments, USA |
| Photometer Beckmann DU 530 | Beckmann Instruments, USA |
| Zweistufen-Vertikalelektroden-Puller L/M-3P-A | List-Medical |
| Schüttler S25 | New Brunswick Scientific, Edison, USA |
| Speedvac | Fischer Laborbedarf |
| Thermostat 5320 | Eppendorf, Hamburg |
| UV-Tisch Gel Doc 2000 | Bio Rad, München |
| Verstärker | |
| - Vorverstärker HS 180, HS160 | |
| - Differentialverstärker CA 100 | |
| - Zweikanalmikroelektroden- verstärker VF 102 | Biologic, Claix, Frankreich |
| Vortexer Reax 2000 | Heidolph |
| Waage | Sartorius, Göttingen |
| Wasserbad | GFL, Burgwedel |
| Zentrifugen - Biofuge 15 | Haraeus, Hanau |
| - Omnifuge 2.0RS | |
| - Sorvall RC5C | Du Pont Instruments, Wilmington, USA |
| Zentrifugenrotoren Sorvall GSA, SS34, HB4 | Du Pont Instruments, Wilmington, USA |
| Zweikanalschreiber W&W 340 | Scientific Instruments, Schweiz |

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Alle Arbeiten wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Für den Umgang mit Mikroorganismen oder DNA wurden ausschließlich sterile Lösungen, Medien, Gefäße, Pipetten und Pipettenspitzen verwendet. Zur Sterilisation wurden die Flüssigkeiten entweder sterilfiltriert oder in einem Dampfautoklaven für 45 min bei 1 bar Überdruck auf 120°C erhitzt.

3.1.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Eine bei -70°C gelagerte Dauerkultur von *E.coli* XL1-Blue wurde auf Eis aufgetaut. Davon wurden ca. 50 µl auf einer tetracyclinhaltigen (12 µg/ml) LB-Festmediumplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Kolonie gepickt, in 10 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde diese Übernachtskultur in 1 l LB-Medium überführt und unter Schütteln (300 rpm) bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,5 bis 0,8 inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur innerhalb einer Stunde auf Eis auf 4°C abgekühlt und durch eine Zentrifugation (4°C /6000 rpm) pelletiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Alle folgenden Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C und mit vorgekühlten, sterilen Lösungen durchgeführt. Das Pellet wurde einmal mit 1 l, dann mit 500 ml eiskaltem Aqua dest. und schließlich mit 20 ml 10% (v/v) Glycerol gewaschen. Dabei wurde nach jedem Waschschrift wie zuvor zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Bakterienpellet in 2 ml 10% (v/v) Glycerol resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in 50 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.1.2 Transformation

3.1.2.1 Elektroporation

Aliquots kompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt und mit ca. 1-2 µl Plasmid-DNA (ca. 50 ng) durch Pipettieren vermischt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser (BioRad) bei 2,5 kV, 25µF und 200 Ohm für ca. 4,5 sec. Zum Transformationsansatz

wurden anschließend 500 µl frisches antibiotikumfreies LB-Medium pipettiert, das Ganze in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 37°C im Roller inkubiert. Danach wurden 75-100 µl auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.2.2 Hitzetransformation

100 µl Epicurian Coli® XL1-Blue superkompetenten Zellen aus dem QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut, in vorgekühlte Falconröhrchen (35-2059) überführt, mit 1-5 µl der Plasmid-DNA durch Pipettieren vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock für 45 sec bei 42°C und eine erneute Kühlung der Zellen für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl auf 37°C vorgewärmten LB-Mediums folgte die Inkubation bei 37°C für eine Stunde. 75-100 µl des Transformationsansatzes wurden dann auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.3 Lagerung von Bakterienkulturen

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienkulturen wurde zu einem Volumen von 1,5 ml einer Übernachtskultur gleiches Volumen einer 30% (v/v) Glycerinlösung zugegeben, gevortext, der Ansatz im flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

3.1.4 Plasmidpräparationen mit Qiagen-Kits

Für die Plasmidpräparation wurden sowohl das QIAprep Spin Miniprep Kit als auch das Qiagen Plasmid Midi/Maxi Kit der Firma Qiagen nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt. In beiden Fällen wurden Übernachtskulturen (5 oder 200 ml) in antibiotikahaltigem LB-Medium durch Zentrifugation pelletiert, und anschließend wurden die Zellen einer alkalischen Lyse unterzogen. Nach Neutralisation wurden alle ausgefallenen Komponenten abzentrifugiert, der Überstand auf eine DEAE-Anionenaustauschersäule aufgetragen und alle störenden Komponenten wie u.a. RNA und Proteine mit einem Puffer mittleren Salzgehalts von der Säule gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit einem Puffer hohen Salzgehaltes und die Präzipitation wurde mit Isopropanol durchgeführt. Die Gesamtausbeute an DNA betrug bei der Minipräparation ca. 10 µg und bei der Maxipräparation ca. 500 µg.

Die isolierten Plasmide konnten direkt für die Sequenzierung oder Mutagenese eingesetzt werden.

3.1.5 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten wurden in dieser Arbeit 0,8 und 3% (w/v) Gele verwendet, die lineare doppelsträngige DNA-Fragmente im Größenbereich von 0,8-10 kb bzw. 0,5-10 kb zu trennen vermögen. Zur Gelherstellung wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE- oder TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde das Gel auf einer Glasplatte, an der ein Kamm befestigt war, gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurde der Kamm entfernt, das Gel in der Gelkammer plaziert, mit dem entsprechenden Puffer überschichtet und mit den Proben bzw. mit 5 µl des entsprechenden Markers beladen. Nach Anlegen der Spannung (ca. 10 V/cm) wurde das Gel ca. 1-2 h bei RT laufen gelassen. Zum Anfärben der Banden wurde es ca. 15 min in einer wässrigen Lösung inkubiert, die 0,5 µg/ml des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid enthielt. Die Detektion und das Fotografieren erfolgten unter UV-Licht (254 oder 302 nm).

3.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Verdau von ca. 2 µg DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen wurden die Fragmente elektrophoretisch getrennt und nach Anfärben mit Ethidiumbromid unter langwelligem UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) visualisiert. Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde dann mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) mit folgendem veränderten Protokoll isoliert. Zu den Gelstücken wurde das dreifache Volumen (w/v) des Puffers QC gegeben und diese ca. 10 min bei 37°C (nicht 50°C!) inkubiert, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hat. Die Inkubation bei der geringeren Temperatur verhindert, dass die DNA-Fragmente z.T. aufgeschmolzen werden und unerwünschte Sekundärstrukturen einnehmen. Anschließend wurde die Mischung auf die im Kit vorhandenen DEAE-Anionenaustauschersäulen gegeben und 1 min zentrifugiert. Nach Waschen mit dem Puffer PE und erneuter Zentrifugation wurde der Überschüssige PE-Puffer abzentrifugiert und die DNA mit 30µl ddH₂O (pH 8,0) eluiert.

3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe des DNA Ligation Kits (MBI Fermentas, St. Leon Rot) durchgeführt. Von den aufgereinigten DNA-Fragmenten wurde zunächst die Konzentration durch Vergleich der Intensitäten der entsprechenden Banden und Marker abgeschätzt. Für die Ligationsreaktion von kohäsiven DNA-Enden wurden Vektor und Insert im molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt, wobei die Vektorkonzentration bei ca. 100-200 ng lag. Im Gesamtvolumen von 10 µl wurden das entsprechende Volumen der DNA-Fragmente mit jeweils 1 µl 10x Ligationspuffer und Ligase (5 U/µl) vermischt und eine Stunde bei RT inkubiert. Nach 15 minütiger Hitzedeaktivierung der Ligase bei 65°C wurden 1,5 µl des Ligationsansatzes elektroporiert. Um größere Volumina des Ligationsansatzes (≤ 5 µl) pipettieren zu können wurden je nach Bedarf die Proben durch Inkubation in 1% auspolymerisierter Agarose in ddH₂O für eine Stunde bei RT entsalzt.

3.1.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

3.1.8.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Grundlage der photometrischen Konzentrationsbestimmung ist das Gesetz von Lambert-Beer, indem der Zusammenhang zwischen der Absorption (E) und Konzentration (c) einer Probe hergestellt ist.

$$E = \ln \frac{I}{I_0} = -\varepsilon \cdot c \cdot d$$

Gleichung 3.1 Gesetz von Lambert-Beer mit I₀: Intensität der eingestrahlten Strahlung; I: Intensität der Strahlung nach Durchtritt der Probe; ε: molarer Absorptionskoeffizient (in cm²/mol); d: Küvettenlänge (in cm); c: Konzentration der absorbierenden Moleküle (in mol/l).

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren und der optischen Dichte (OD) von Bakterienkulturen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (E₂₆₀) bzw. 600 nm (E₆₀₀) gegen das entsprechende Lösungsmittel gemessen. Nukleinsäurelösungen wurden im Verhältnis 1:50 oder 1:100 verdünnt und die Messung erfolgte in Quarzküvetten. Für die Konzentrationen reiner Nukleinsäurelösungen bzw. Bakteriensuspensionen gilt nach Sambrook et al. (1989):

1 E₂₆₀-Einheit ≅ 50 µg doppelsträngiger DNA/ml

1 E₂₆₀-Einheit ≅ 40 µg einzelsträngiger DNA oder RNA/ml

1 E₆₀₀-Einheit \cong 8 x 10⁸ Zellen/ml

Zur Bestimmung der Reinheit von DNA- sowie RNA-Lösungen wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gegen das Lösungsmittel gemessen. Ist die Nukleinsäurelösung nicht mit Proteinen und/oder Phenol verunreinigt, so sollte der Quotient E₂₆₀/E₂₈₀ bei DNA-Lösungen bei 1,8 - 2,0 und bei RNA-Lösungen >2,0 liegen.

3.1.8.2 Konzentrationsbestimmung durch Ethidiumbromid-Agarosegele

Aufgrund der planaren Struktur von Ethidiumbromid kann sich dieser Fluoreszenzfarbstoff zwischen den Basen der Nukleinsäuren anlagern. Nach Bestrahlung mit UV-Licht emittieren EtBr-Moleküle Fluoreszenzstrahlung, die durch die Wechselwirkung mit den Basen im Vergleich zum freien EtBr in der Intensität erhöht ist. Da die Intensität der Fluoreszenzstrahlung proportional zur Gesamtmenge an DNA ist, ist eine Quantifizierung der DNA durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität der DNA-Banden im Agarosegel mit den Banden eines Markers bekannter DNA-Konzentration möglich, d.h. man vergleicht die Intensitäten der Banden und schätzt die Menge in der interessierenden Bande ab.

3.1.9 Ethanolfällung

Die Ethanolfällung wird als Standardverfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen verwendet. Zu der Nukleinsäurelösung wurden erst 0,15 Teile einer 3 M Natriumacetatlösung, pH 5,2, dann 2,5 Teile eiskalten Ethanols (abs.) zugegeben und nach gründlichem Mischen folgte eine Zentrifugation bei 15000 rpm, 4°C, für 15 min. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen und erneut 5 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach vollständiger Abnahme des Überstandes wurde das Pellet bei RT ca. 10 min lang getrocknet, anschließend im entsprechenden Volumen TE-Puffer oder deionisierten Wasser aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

3.1.10 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion

Bei der Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol handelt es sich um eine Standardmethode zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen. Dabei wurde zur Nukleinsäurelösung gleiches Volumen einer 25:24:1 (v/v) Mischung von

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol zugegeben, das Ganze gemischt und 1 min bei 15000 rpm zentrifugiert, um die Phasentrennung zu beschleunigen. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit gleichem Volumen Chloroform gemischt und wie zuvor zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die entsprechende Nukleinsäure durch eine Ethanolfällung pelletiert und nach dem Trocknen in TE-Puffer oder deionisiertem Wasser aufgenommen.

3.1.11 PCR-Mutagenese

Zur Einführung von Mutationen ins Wildtypplasmid wurde das QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Die in diesem Kit enthaltene PfuTurbo™ DNA-Polymerase ist in der Lage, beide Stränge des ganzen Plasmids zu amplifizieren und hat neben der 5'-3'-Polymeraseaktivität auch eine 5'-3'-Exonucleaseaktivität, die als proof-reading-Aktivität dient. Alle Oligonukleotide waren 23-42 bp lang und wurden von der Firma MWG Biotech AG synthetisiert. Das Prinzip des PCR-Mutagenese-Kits wird mit folgender Abbildung veranschaulicht:

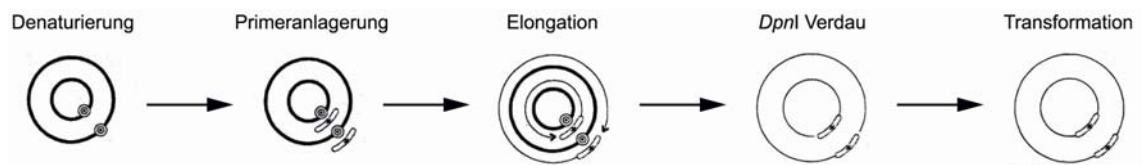


Abb. 3.1 Überblick über das Prinzip des QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits (nach Arbeitsanleitung des Kits verändert (Stratagene))

In der PCR-Reaktion findet zunächst die Denaturierung der DNA statt (1). Anschließend lagern sich die Primer (2), die die gewünschte Mutation enthalten, an die Zielsequenz an, gefolgt von der Verlängerung der Primer durch die PfuTurbo™ DNA-Polymerase (3). Nach dem PCR-Protokoll wird der methylierte Wildtypstrang mit *Dpn* I verdaut (4). *Dpn* I ist eine Endonuklease mit der Erkennungssequenz: 5'Gm6ATC-3'. Nach dem Verdau wird das amplifizierte, mutierte Plasmid durch Hitzetransformation (5) in Epicurian Coli® XL1-Blue superkompetente Zellen eingeführt. Dort werden die Strangbrüche durch bakterielle Ligasen geschlossen. Die PCR-Reaktion wurde sowohl mit dem Wildtypplasmid, in das die Mutationen eingeführt werden sollten, als auch mit dem im Kit enthaltenen Kontrollplasmid

pWhitescript™ 4,5 kb durchgeführt.

Für die PCR-Reaktionen wurden folgende Mengen eingesetzt:

Kontrollreaktion:

5 µl 10x Reaktionspuffer

2 µl (10 ng) Kontrollplasmid

1,25 µl (125 ng) Kontrollprimer #1

1,25 µl (125 ng) Kontrollprimer #2

1 µl dNTP mix

1 µl PfuTurbo™ DNA-Polymerase (2,5 U/µl)

ad 50 µl ddH₂O

Mutagenese-Reaktion:

5 µl 10x Reaktionspuffer

x µl (30 ng) dsDNA-Plasmid

1,25 µl (125 ng) sense Primer

1,25 µl (125 ng) antisense Primer

1 µl dNTP mix

1 µl PfuTurbo™ DNA-Polymerase (2,5 U/µl)

ad 50 µl ddH₂O

Die PCR-Reaktion wurde mit folgendem Protokoll durchgeführt:

Tab. 3.1 PCR-Protokoll.

| Anzahl der Zyklen | Temperatur [°C] | Dauer | Reaktion |
|-------------------|-----------------|--------|----------------------------|
| 1 | 95 | 1 min | initiale DNA-Denaturierung |
| 18 | 95 | 50 s | DNA-Denaturierung |
| | 60* | 50 s | Primer-Anlagerung |
| | 68 | 15 min | DNA-Elongation |
| 1 | 68 | 7 min | terminale DNA-Elongation |

*Je nach Primer wurde die Anlagerungstemperatur zwischen 55 und 62°C variiert.

Für den Verdau der methylierten DNA wurde zum PCR-Mix 1 µl *Dpn* I (10 U/µl) zugegeben, gut gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. 1-5 µl des Ansatzes wurden dann mittels Hitzetransformation in Epicurian Coli® XL1-Blue superkompetente Zellen oder mittels Elektroporation in *E.coli* XL1-Blue elektrokompente Zellen eingeführt.

3.1.12 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau wurde nach Standardvorschriften (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Für die Reaktion benötigte Enzymmenge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Enzym (U) / DNA (}\mu\text{g)} = \frac{L(\lambda) \cdot S(P)}{L(P) \cdot S(\lambda)}$$

Gleichung 3.2 Berechnung der Enzymeinheiten pro eingesetzter DNA-Menge in μg , mit: $L(\lambda)$: Länge des Phagengenoms λ in Basenpaaren; $L(P)$: Länge der zu verdauenden DNA bzw. des Plasmids in Basenpaaren; $S(\lambda)$: Anzahl der Enzymschnittstellen in der zu verdauenden DNA/Plasmid und $S(P)$: Anzahl der Enzymschnittstellen im λ -Phagengenom.

Es wurde stets die doppelte Menge an Enzym im variierenden Gesamtvolumen verwendet. Der Verdau fand immer nach den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen statt, wobei 4-12 h bei 37°C inkubiert wurde. Das Enzym wurde anschließend durch eine zehnminütige Inkubation bei 70°C deaktiviert.

3.1.13 Sequenzierung (Sanger *et al.* 1977)

Als Sequenziermethode wurde das Didesoxyverfahren, auch Kettenabbruchmethode, nach Sanger verwendet. In diesem Verfahren wird der interessierende DNA-Bereich mittels PCR amplifiziert, jedoch werden außer den beiden Primern und den 2'-Deoxynukleosid-5'-Triphosphate (dNTPs) auch die Nukleotid-Analoga 2',3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphate (ddNTPs) eingesetzt, die auch als Terminatoren bezeichnet werden. Die ddNTPs tragen je nach Base vier verschiedene Succinylfluoresceine. In der PCR-Reaktion findet mit statistischer Verteilung nach jeder Base ein Kettenabbruch statt, d.h. jedes PCR-Produkt trägt an seinem Ende eine für die letzte Base spezifische Fluoreszenzgruppe, die die spätere Detektion ermöglicht.

Ansatz für die PCR-Reaktion:

x μl (100 - max. 500 ng) DNA

5 pmol Primer

4 μl Sequenzierpremix

ad 10 μl ddH₂O

Tab. 3.2 PCR-Protokoll für die Sequenzierung.

| Anzahl der Zyklen | Temperatur [°C] | Dauer | Reaktion |
|-------------------|-----------------|--------|-------------------|
| 25 | 95 | 20 sec | DNA-Denaturierung |
| | 50 | 15 sec | Primer-Anlagerung |
| | 60 | 1 min | DNA-Elongation |

Nach der PCR-Reaktion wurden zum PCR-Ansatz 10 µl ddH₂O pipettiert und über die Amersham xy Säulen aufgereinigt (Amersham Bioscience, Freiburg) und in die Sequenzermatrix injiziert. Die terminale Base wurde mit einem Argon-Laser angeregt und ihre emittierte Fluoreszenz detektiert. Somit konnte die gesamte Sequenz aus den verschieden langen Einzelfragmenten bestimmt werden. Sequenzierung und Elektrophorese erfolgten automatisch im DNA-Sequencer MegaBace 500 (Fa. Amersham Bioscience, Freiburg) statt. Einige Sequenzierungen wurden auch durch die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) vorgenommen.

3.1.14 *in vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription wurde mit dem mCAP™ RNA Capping Kit (Stratagene) oder dem SP6 Message Machine Kit (Ambion) durchgeführt. Vorteil beider Kits ist, dass cRNA mit 5'-Capstruktur (5'-7MeGpppG-3') synthetisiert wird und dadurch ihre Stabilität bzw. ihre Translationseffizienz *in vivo* erheblich erhöht wird. Während der Durchführung sollten stets Handschuhe getragen werden. Außerdem sollte jede Lösung mit DEPC-H₂O angesetzt werden. Die Gelapparatur, die Glasplatte und der Kamm für die Agarosegelelektrophorese wurden für ca. 10 min in 10% SDS-Lösung aufbewahrt und anschließend mit DEPC-H₂O gespült. Um gleich lange mRNA-Moleküle zu erhalten, wurden 10 µg des DNA-Plasmids vor der RNA-Synthese direkt nach dem zu transkribierenden Insert mit 10 U des Restriktionsenzym *NotI* über Nacht linearisiert, wobei danach das Restriktionsenzym durch Zugabe von 1 µl Proteinase K (1 mg/ml) 30 min lang verdaut wurde. Um die Proteinase K und andere Enzyme, wie RNasen zu entfernen, wurde eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion durchgeführt und die linearisierte DNA mittels Ethanol-fällung pelletiert, nochmals mit 80% Ethanol in DEPC-H₂O gewaschen, getrocknet und in 12 µl RNasefreiem TE-Puffer aufgenommen.

Folgender Ansätze werden für die cRNA-Synthese benötigt:

| | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| Stratagene Kit | Ambion Kit |
| 5 µl 5xTranskriptionspuffer | 2 µl 10xTranskriptionspuffer |
| 2 µg linearisiertes Plasmid | 2 µg linearisiertes Plasmid |
| 1µl rNTP-Mix | 10 µl NTP mix |
| 2,5 µl mCAP-Analog | 2 µl Enzymmix |
| 1 µl 0,75M DTT | ad 20 µl DEPC-H ₂ O |
| 1 µl RNase Inhibitor (x U/µl) | |
| 1µl Sp6 RNA-Polymerase (30U) | |
| ad 25 µl DEPC-H ₂ O | |

Die cRNA-Synthesereaktion wurde dann 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die DNA durch Zugabe von 1 µl RNasefreier DNase I 15 min lang verdaut, die RNA zunächst mittels PCI-Behandlung extrahiert und dann mit Ethanolfällung pelletiert. Das Pellet wurde gewaschen und in 15 µl RNasefreien TE-Puffer aufgenommen. Die Quantifizierung der cRNA erfolgte sowohl durch photometrische Absorptionsbestimmung als auch durch Agarose-Gelelektrophorese.

3.2 Elektrophysiologische Methoden

3.2.1 Das *Xenopus laevis* Oozytenexpressionssystem

Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist ca. 5-10 cm groß und gehört zur Familie der Pipidae. Dorsal ist der Frosch hell- bis dunkelgrau und grünlich gefleckt, während er ventral eine hellgelbe Färbung aufweist. An den Hinterbeinen befinden sich zwischen den Krallen starke Schwimmhäute, und an den Vorderarmen sind die vier Finger, die bei der Futtersuche und beim Fressen eingesetzt werden, da das vollkommen aquatisch lebende Tier keine Zunge besitzt, die sonst zum Futterfang bei Fröschen verwendet wird.



Abb. 3.2 *Xenopus laevis*-Weibchen (Quelle http://cbrmed.ucalgary.ca/pvize/html/random_pic/pns.html)

In dieser Arbeit wurden Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem für den Glycinrezeptor verwendet. Diese sind Vorläufer der Eizellen und durchlaufen sechs Entwicklungsstadien (I-VI), wobei nur Oozyten im Stadium V und VI für elektrophysiologische Untersuchungen geeignet sind. Es handelt sich dabei um recht große Zellen mit einem Durchmesser von 1-1,4 cm. Die Oozyten stellen ein ideales Expressionssystem für Ionenkanäle und ligandengesteuerte Neurotransmitterrezeptoren dar, da diese selbst kaum auf ihrer Oberfläche vorhanden sind und die Expression von Fremd-cRNA problemlos und schnell erfolgt. Folgende Abbildung soll die Vorgehensweise bei der Nutzung von Oozyten als Expressionssystem veranschaulichen. Alle in der Abbildung aufgeführten Schritte werden im folgenden genauer beschrieben.

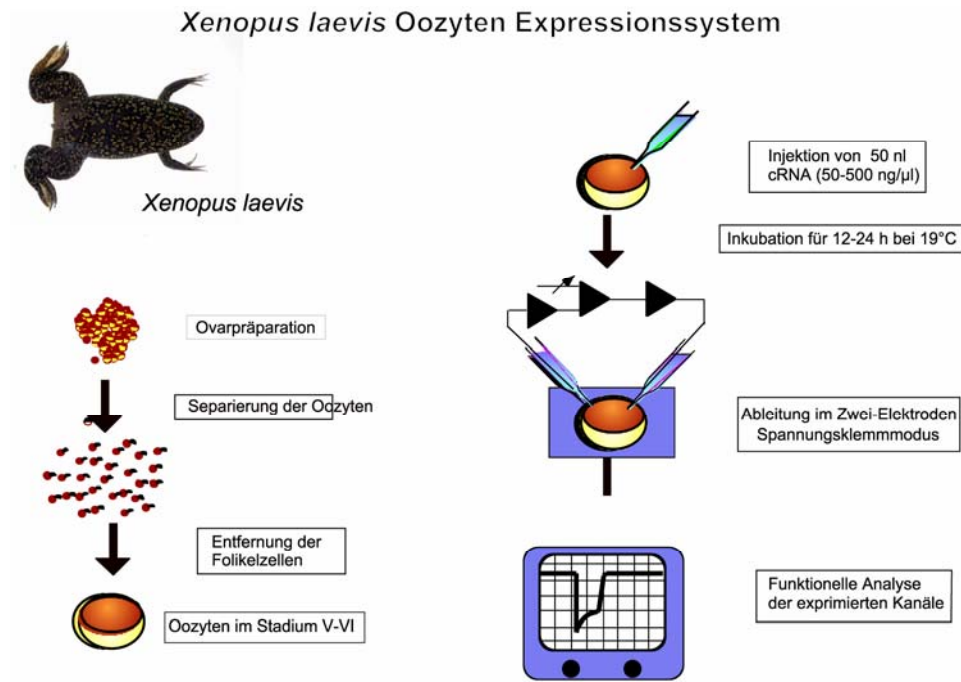


Abb. 3.3 Schematische Darstellung des Oozytenexpressionssystems (Snutch, 1988).

3.2.2 Haltung der Frösche

Weibchen im Alter von 2-4 Jahren wurden in großen Aquarien (200 l) in Gruppen von 10 Fröschen gehalten. Um äußere Reize fernzuhalten, waren die Aquarien in einem gesondertem Raum aufgestellt. Der Tag/Nachtrhythmus (16/8 h) wurde über die Lichtautomatik geregelt und das 20°C warme Wasser ständig über einen Aktivkohlefilter aufbereitet. Die Fütterung erfolgte 2x wöchentlich mit einem Spezialfutter (Altromin 0830), wobei während dessen die Wasseraufbereitung für einige Stunden gestoppt wurde.

3.2.3 Oozytenentnahme

Der Frosch wurde zunächst für ca. 50 min in 1% (w/v) Urethan-Lösung oder 10 min in 0,5% MMS pH 7,0 narkotisiert und dann auf Eis platziert. Ein Teil des Ovars (1-5 ml) wurde durch je einen ca. 1 cm langen Schnitt durch Haut- und Muskelschicht von ventral entnommen und in Barth's Medium überführt. Der Schnitt wurde zunächst in der Muskel- und dann in der Hautschicht mit je 2-4 Stichen vernäht. Anschließend wurde der Frosch in frischem Wasser ca. 1 h aufbewahrt, bevor er in das Aquarium, zurückgebracht wurde.

3.2.4 Präparation der Oozyten

Die frisch entnommenen Oozyten wurden zunächst mit einer Schere in kleinere Teile zerschnitten. Um die die Oozyten umgebende Follikelzellschicht zu verdauen, wurde zum Barth's Medium Kollagenase Typ IIA (1 mg/ml) hinzugegeben und 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Oozyten dreimal mit Ringer gewaschen, 15 min in Ca^{2+} -freiem Ringer inkubiert, damit sich die Follikelzellen von den Oozyten lösen, und wieder mit Ringer gewaschen. Unter dem Binokular wurden nur Oozyten im Stadium V und VI ausgesucht und später für die Injektion der mRNA verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass diese Oozyten auch eine gleichmäßige Färbung vom animalischen und vegetativen Pol aufzeigten. Bis zur Injektion wurden die Oozyten bei 4°C aufbewahrt.

3.2.5 Injektion der cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten

Zuerst wurden die Injektionskapillaren aus Borosilikatglas (1,8 mm Außendurchmesser, Hilgenberg) mit dem Zweistufen-Vertikalelektroden-Puller hergestellt. Der Spitzendurchmesser der Kapillaren wurde mit Hilfe der Mikroschmiede überprüft und bei Bedarf durch Abbrechen auf 6-8 μm korrigiert. Die Injektion der cRNA erfolgte mit Hilfe eines Injektionstisches (Eigenbau), an dem sich ein Mikromanipulator und ein Binokular befanden. Die Injektionskapillare wurde in der Halterung des Mikromanipulators befestigt und die 1-2 μl cRNA wurden in ein Deckel eines 1,5 ml Eppendorfgefäßes pipettiert. Mit dem Mikromanipulator wurde die Injektionskapillare in den cRNA-Tropfen plaziert und durch Anlegen eines Unterdrucks wurde die Lösung in die Kapillare gesaugt. Die Kapillare wurde in die im Schlitten aufgereihten Oozyten eingestochen und durch Anlegen eines Überdrucks wurden je Oozyte ca. 50 nl einer 0,01-0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konzentrierten cRNA-Lösung injiziert. Die Oozyten wurden anschließend 12-24 h bei 19 °C inkubiert.

3.2.6 Ableitung im Spannungsklemmenmodus (Engl. voltage clamp)

3.2.6.1 Aufbau des Meßstandes

Der Meßstand befand sich auf einem gedämpften Labortisch aus Marmor, der von einem Faraday-Käfig aus Aluminium umgeben war. Zum Meßstand gehörten zwei in drei Raumrichtungen bewegliche Mikromanipulatoren und zugehörige Halterungen,

ein Binokular mit Beleuchtung, eine Plexiglasableitkammer (Eigenbau) mit Ab- und Zulauf, drei Silber/Silberchloridelektroden - eine Spannungs- eine Strom- und eine Referenzelektrode - und zwei Vorverstärker - HS 180 für die Spannungselektrode und HS 160 für die Stromelektrode. Folgende Abbildung soll den Aufbau veranschaulichen:

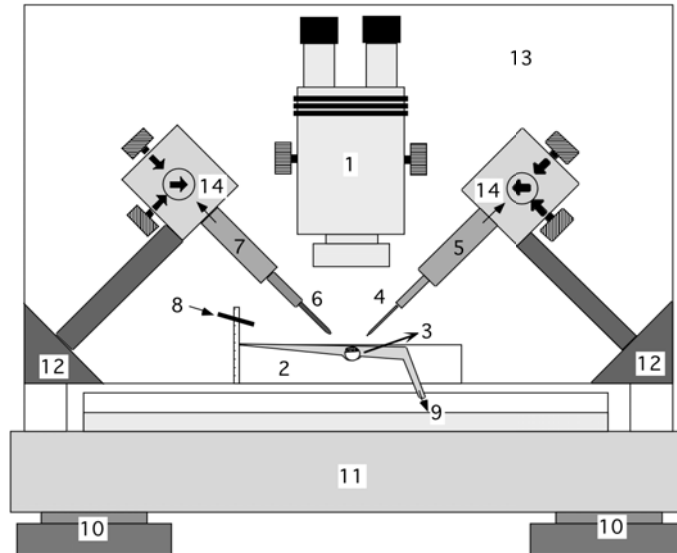


Abb. 3.4 Schematische Darstellung des Meßstandes für die elektrophysiologischen Messungen.

Die Nummern in der Abbildung bezeichnen: 1 Binokular; 2 Plexiglasableitkammer; 3 Referenzelektrode; 4 Spannungselektrode; 5 Vorverstärker HS 180 mit Ausgang zum Zweikanal-Mikroelektrodenverstärker VF 102; 6 Stromelektrode; 7 Vorverstärker HS 160 mit Ausgang zum Treiberverstärker VF 102; 8 Zulauf der Badperfusion; 9 Abfluss der Badperfusion mit Auffangbehälter; 10 luftgefülltes Schwingungsdämpfungssystem; 11 Labortisch aus Marmor; 12 Säulen und Halterungen zur Befestigung der Mikromanipulatoren; 13 Faraday-Käfig aus Aluminium; 14 mechanische Mikromanipulatoren beweglich in allen drei Raumrichtungen.

3.2.6.2 Herstellung von Ableitelektroden

Die Elektroden wurden aus Borosilikatglaskapillaren (1,2 mm Außendurchmesser, WPI) mit dem Zweistufen-Vertikalelektroden-Puller hergestellt. Ihr Spitzendurchmesser wurde mit Hilfe der Mikroschmiede überprüft und bei Bedarf durch Abbrechen auf 2 μm korrigiert. Die Elektroden wurden mit 3 M KCl-Lösung luftblasenfrei befüllt und für die Messung verwendet.

3.2.6.3 Chlorierung der Silberelektroden

Die Elektrodendrähte wurden zunächst gründlich abgeschmirgelt und anschließend elektrolytisch zu Silberchlorid in einer 0,1 N Salzsäurelösung oxidiert. Der Elektrodendraht wurde dazu an die Anode (+) einer 3 V Batterie geschaltet und ein

zweiter Silberdraht diente als Kathode (-). Nach ca. 2-5 min bildete sich eine dunkle Silberchloridschicht um den Elektrodendraht.

3.2.6.4 Theoretischer Hintergrund der Zweielektroden-Spannungsklemme

Das Zweielektroden-Spannungsklemm-Experiment (engl. Voltage Clamp-Experiment) beruht auf einer Rückkopplungsmethode, bei der vom Verstärker eine bekannte Kommandospannung U_{com} erzeugt und der zur Aufrechterhaltung dieser Spannung benötigte Strom gemessen wird. Insgesamt werden drei Silber/Silberchlorid-Elektroden verwendet, wobei zwei in der Zelle (Strom- und Spannungselektrode) und eine im Bad (Referenzelektrode) neben der Oozyte platziert sind. Die Spannungselektrode misst passiv das über der Zellmembran anliegende Potential, während die Stromelektrode durch Stromzufuhr das Membranpotential U_{mem} aktiv reguliert. Von der Spannungselektrode gelangt das Signal über den Vorverstärker HS („headstage“) 180 und über den Zweikanal-Mikroelektrodenverstärker Typ VF 102 zum Differentialverstärker CA 100. Der Differentialverstärker vergleicht die Kommandospannung U_{com} mit dem vorliegenden Membranpotential U_{mem} und erzeugt bei einer Abweichung der beiden eine Klemmspannung U_{clam} . Diese Klemmspannung U_{clam} wird im Treiberverstärker VF 102 in ein entsprechendes Stromsignal I_m übersetzt und über den Vorverstärker HS 160 zur Stromelektrode geleitet.

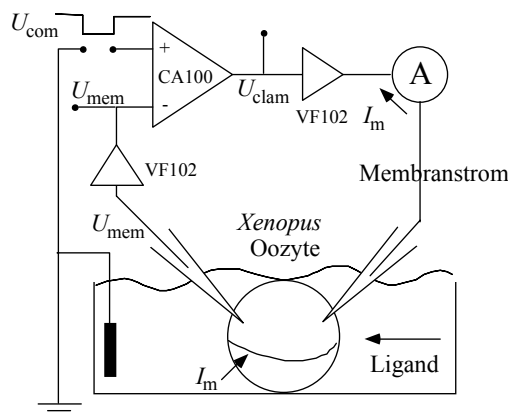


Abb. 3.5 Schematische Darstellung des Schaltbilds des Voltage Clamp-Experimentes. Das Membranpotential der Zelle (U_{mem}) wird zunächst über den Vorverstärker in den Spannungsverstärker (VF 102) zur Messung des Membranpotentials und von dort zum Differentialverstärker weitergeleitet. Im Vergleich zum Haltepotential (U_{com}) wird vom Differentialverstärker (CA 100) eine Klemmspannung (U_{clam}) erzeugt, die im Treiberverstärker (VF 102) in den entsprechenden Strom (I_m) umgewandelt wird. Am Ausgang kann die Spannung als korrespondierendes Stromsignal abgegriffen werden.

Alle Meßsignale wurden mit einem digitalen Oszilloskop kontrolliert und mit dem Zweikanalschreiber aufgezeichnet. Zusätzlich erfolgte auch die Aufnahme der Meßdaten mit dem PC durch Verwendung der Software Clampex 8.0.

3.2.6.5 Aufnahme und Auswertung von Dosiswirkungskurven der Agonisten Glycin und Taurin

Zur Durchführung der Experimente wurde die Oozyte in die dafür vorgesehene Einkerbung in der Plexiglaskammer platziert. Mit Hilfe der Mikromanipulatoren wurden die Elektroden zunächst im Bad gegeneinander abgeglichen und dann in die Zelle eingestochen, die Spülung mit Frosch-Ringer angeschaltet und das Haltepotential von -70 mV angelegt. Für die Aufnahme der Dosiswirkungskurven wurden $500\text{ }\mu\text{l}$ der entsprechend konzentrierten Agonistenlösung manuell mit der Pipette innerhalb von ca. 5-10 sec appliziert. Während der Applikation wurde die Spülung mit Frosch-Ringer ausgeschaltet und erst nach beginnendem Abklingen des Signals eingeschaltet. Die Spüldauer zwischen den Applikationen betrug je nach verabreichter Agonistenkonzentration 1-3 min. Es wurden nacheinander aufsteigende Agonistenkonzentrationen zugegeben, wobei die Stabilität der Antworten durch Applikation der Agonistenkonzentration, die sich in der Nähe des EC_{50} -Wertes befand, überprüft wurde. Die Datenauswertung wurde mit dem Programm KaleidaGraph 3.5 (Synergy Software, Reading, USA) durchgeführt. Aufgetragen wurden jeweils die auf den Maximalstrom normierten Stromantworten gegen den Logarithmus der Agonistenkonzentration. Die Bestimmung der halbmaximalen Sättigung des Rezeptors durch den Liganden (EC_{50} -Wert) und des Kooperativitätsfaktors n (Hill-Koeffizient) wurden durch Anpassung der Dosiswirkungskurven mit Hilfe der Gauss-Marquard-Iteration an Gleichung 3.3 erhalten.

$$I = \frac{I_{\max} \cdot [A]^n}{[A]^n + \text{EC}_{50}^n}$$

Gleichung 3.3 mit I: Stromfluss, I_{\max} , maximaler Stromfluss, A: Agonistenkonzentration, n : Hillkoeffizient, EC_{50} : Agonistenkonzentration, die halbmaximalen Stromfluss verursacht.

3.2.6.6 Aufnahme und Auswertung der Inhibierungskurven des Antagonisten Strychnin und des Modulators MBN

Da beide Liganden Strychnin und MBN eine langsamere Geschwindigkeitskonstante der Assoziation als Glycin haben, wurden für die Aufnahme der Inhibierungskurven für jede Applikation zwei Lösungen benötigt. Zunächst wurde nur der Antagonist bzw. der Modulator in Frosch-Ringer appliziert, und nach ca. 5 sec wurde eine Mischung aus der gleichen InhibitorKonzentration und der für den Wildtyp oder für die Mutante entsprechenden EC₅₀-Konzentration an Glycin zugegeben. Zur Zeit der Applikationen wurde die Spülung ausgeschaltet und erst bei abnehmendem Signal wieder eingeschaltet. Im Verlauf der Messung wurden zunehmend höhere Strychnin- bzw. MBN-Konzentration verabreicht, während die Glycinkonzentration immer konstant blieb. Die Stabilität der Signale wurde zu Beginn jeder Messung durch mehrmalige Applikation der Glycinklösung (EC₅₀-Konzentration) überprüft.

Wie bei der Auswertung der Dosiswirkungskurven von Glycin und Taurin wurde auch bei der Auswertung der Inhibierungskurven das Programm KaleidaGraph 3.5 verwendet. Die Anpassung der Inhibierungskurven mittels Gauss-Marquard-Iteration zur Ermittlung der halbmaximalen Inhibierungskonzentration des Antagonisten erfolgte mit folgender Gleichung.

$$I = \frac{I_{\max} \cdot \left[\frac{1}{B} \right]^n}{\left[\frac{1}{IC_{50}} \right]^n + \left[\frac{1}{B} \right]^n}$$

Gleichung 3.4 mit I: Stromfluss, I_{max}, maximaler Stromfluss, B: Antagonistenkonzentration, n: Hillkoeffizient, IC₅₀: Antagonistenkonzentration, die halbmaximalen Inhibierung verursacht.

3.2.6.7 Aufnahme der Potenzierung des Modulators MBN

Um die Potenzierung deutlicher sehen zu können, wurde statt des vollen Agonisten Glycin, der partielle Agonist Taurin für diese Messungen verwendet. Die Aufnahme der Potenzierung durch den Modulator MBN erfolgte durch Vorapplikation von 100 µl der entsprechenden MBN Konzentration und einer Inkubationszeit von 1 min mit ausgeschalteter Ringerspülung. Anschließend wurde sofort Taurin appliziert. I.d.R. wurde eine sehr niedrige Taurinkonzentration verwendet, die dem jeweiligen EC₁₀ Wert des Wildtyps bzw. der Mutation entsprach. Jede Stromantwort nach

Vorinkubation mit MBN wurde gegen die vorherige Taurinstromantwort normiert und in Prozent angegeben.

3.2.6.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm KaleidaGraph 3.5. Dabei wurde von einer Gausschen Normalverteilung der Daten ausgegangen und zunächst der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts bestimmt. Für den Vergleich zwischen Mutante und Wildtyp wurde für jede ermittelte Größe, wie EC_{50} , IC_{50} , Hillkoeffizient n und Maximalstrom I_{max} , der Student's t-Test durchgeführt, um auf Signifikanz zu untersuchen. Zwei Werte werden als signifikant unterschiedlich bezeichnet, wenn der T-Wert kleiner als 1% ist.

3.3 Molekulares Modelling

Die Ligandenbindungsmodelle wurden in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Rudolf Schemm mit dem Programm SYBYL 6.9 (Tripos Associates, St. Louis, USA) folgendermaßen erstellt. Der Sequenzvergleich der extrazellulären N-terminalen Domänen der GlyR α 1- und β -Untereinheit mit dem AChBP wurde mit geringen Änderungen von Brejc et al. (2001) übernommen. Basierend auf der Kristallstruktur des AChBP (Brejc et al., 2001) wurde die C α -Hauptkette generiert, indem strukturell konservierte Regionen (SCRs) an die α -Helix und die β -Faltblätter des AChBPs angepasst wurden. Die fehlenden Peptidfragmente wurden dann aus der Sybyl-Protein-Datenbank durch die Anwendung „COMPOSER“ mit den SCRs verbunden. Alle folgenden Abläufe wurden mit Hilfe des „Tripos-Kraftfeldes“ und der „Kollmann all-atom charges“ durchgeführt (siehe Handbuch Tripos SYBYL 6.9, Tripos Associates, St. Louis, USA). Nach Hinzufügen aller Wasserstoffatome wurde das Strukturmodell mehreren, molekulardynamischen Simulationsrunden (NTV Ensemble, 300 K) für 100-1000 fs unterzogen und anschließend in der Abwesenheit des Lösungsmittels energieminiert (Powell Methode; Gradient 0,1 kcal/mol*Å). Dieses Verfahren wurde solange wiederholt, bis ein Energieminimum erreicht wurde. Dann wurden die entsprechenden Liganden mit Hilfe der Anwendung DOCK in der Bindungstasche der extrazellulären Domäne des Wildtyprezeptors platziert, wobei zunächst eine ähnliche Ausrichtung wie die des in der AChBP-Struktur gebunden HEPES-Puffermoleküls gewählt wurde. Die individuellen Liganden-Proteinkomplexe wurden mehrmals molekulardynamischen Simulationsrunden unter Verwendung des Tripos-Kraftfeldes bis zu 100 fs unterzogen. Im Fall mehrerer Dockingkonformationen wurde die energetisch niedrigste gewählt. Um die endgültige Struktur zu erhalten, wurde die Energie mit dem Powell-Algorithmus so lange minimiert, bis ein Gradient von 0,01 kcal/mol erreicht wurde.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Membranpräparation

Die Oozyten (10-20 Stück) wurden im Homogenisierungspuffer (Puffer B oder HNE Puffer, siehe Material; 20µl/Oozyte) aufgenommen, durch 20x Pipettieren lysiert, und dann wurden bei 1000 g, 4°C für 10 min die Zellkerne abzentrifugiert. Anschließend wurden aus dem Überstand die Membranen bei 10.000 g, 4°C, 30 min lang pelletiert. Das Membranpellet wurde im Homogenisierungspuffer (i.d.R. 30 µl) aufgenommen und der SDS-Polyacrylamidelektrophorese mit anschließendem Immunoblotting unterzogen.

3.4.2 SDS-Polyacrylgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Standardprotokoll von Coligan (1995). Da SDS in den meisten Fällen in einem konstanten Verhältnis an Proteine bindet, wird die eigentliche Ladung des Proteins durch die negative Ladung von SDS maskiert. Deshalb weisen SDS-beladene Proteine nahezu identische Ladungs-Masse-Verhältnisse auf und können entsprechend ihrer Masse elektrophoretisch getrennt werden. In der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden zwei Gelsysteme mit Puffern unterschiedlicher pH-Werte verwendet (Sammelgel pH 6,8 und Trenngel pH 8,8), um die Bandenschärfe zu erhöhen. Bei der SDS-PAGE handelt es sich um ein denaturierendes Verfahren, da nach Bindung des Detergens die Tertiärstruktur des Proteins zerstört wird. Zusätzlich werden Disulfidbrücken durch die Zugabe von Reduktionsmitteln (DTT oder β -Mercaptoethanol) gespalten. Die Gele wurden nach folgender Anleitung gegossen:

Tab. 3.3 Pipettieranleitung für SDS-PAGE Trenngele.

| Trenngel | 12% | | 10% | | 9% | | 8% | |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|---------|
| | 2 Gele | 4 Gele | 2 Gele | 4 Gele | 2 Gele | 4 Gele | 2 Gele | 4 Gele |
| 2 Gele = 10 ml | | | | | | | | |
| H₂O | 4,3 ml | 8,6 ml | 4,8 ml | 9,6 ml | 5,0 ml | 10,0 ml | 5,3 ml | 10,6 ml |
| 1,5 M Tris pH 8,8 | 2,5 ml | 5 ml | 2,5 ml | 5 ml | 2,5 ml | 5 ml | 2,5 ml | 5 ml |
| 10% SDS | 100 µl | 200 µl | 100 µl | 200 µl | 100 µl | 200 µl | 100 µl | 200 µl |
| 40% Acrylamid/Bis | 3,0 ml | 6,0 ml | 2,5 ml | 5,0 ml | 2,3 ml | 4,6 ml | 2,0 ml | 4,0 ml |
| 10% APS | 100 µl | 200 µl | 100 µl | 200 µl | 100 µl | 200 µl | 100 µl | 200 µl |
| TEMED | 10 µl | 20 µl | 10 µl | 20 µl | 10 µl | 20 µl | 10 µl | 20 µl |

Tab. 3.4 Pipettieranleitung für SDS-PAGE Sammelgele.

| Sammelgel | 5% | | 4% | | 3% | |
|--------------------------|---------|--------|--------|--------|---------|--------|
| | 2 Gele | 4 Gele | 2 Gele | 4 Gele | 2 Gele | 4 Gele |
| 2 Gele = 6 ml | | | | | | |
| H₂O | 3,6 ml | 7,2 ml | 3,8 ml | 7,6 ml | 3,9 ml | 7,8 ml |
| 0,5 M Tris pH 6,8 | 1,5 ml | 3,0 ml | 1,5 ml | 3,0 ml | 1,5 ml | 3,0 ml |
| 10% SDS | 60 µl | 120 µl | 60 µl | 120 µl | 60 µl | 120 µl |
| 40% Acrylamid/Bis | 0,75 ml | 1,5 ml | 0,6 ml | 1,2 ml | 0,45 ml | 0,9 ml |
| 10% APS | 60 µl | 120 µl | 60 µl | 120 µl | 60 µl | 120 µl |
| TEMED | 10 µl | 20 µl | 10 µl | 20 µl | 10 µl | 20 µl |

Zum Nachweis der entsprechenden-Untereinheiten des GlyRs wurden i.d.R. 9% Trenn- und 3% Sammelgele benutzt. Es wurden maximal 50 µg Protein mit entsprechender Menge 4x SDS-Probenpuffer versetzt und entweder bei RT oder bei 37°C 10-20 min denaturiert. Die Gele wurden in die MiniProtean Apparatur (Biorad, München) eingebaut und diese mit Laufpuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA/Gel.

3.4.3 Western-Blotting und Immunodetektion

Nach der SDS-PAGE wurden die nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine durch elektroporetischen Transfer (Blotting) auf Nitrocellulosemembran (Protan, Schleicher & Schuell) nach der Semidry-Methode immobilisiert. Zunächst wurden das Gel und die Membran im Transferpuffer 10 min lang inkubiert. Anschließend wurden drei Lagen im Transferpuffer äquilibrierten Whatmann-Filterpapier in der Semidry-Apparatur platziert. Auf das Filterpapier folgte die

Membran, dann das Gel und zuletzt wieder drei Lagen Whatmann-Filterpapier. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von $2,5 \text{ mA/cm}^2$ für 30 min. Zur Visualisierung der transferierten Banden wurde die Membran für 30 Sekunden mit Ponceau S-Lösung angefärbt und erst mit H_2O , dann mit TBST entfärbt. Nach ausreichender Entfärbung wurde die Membran in eine Klarsichthülle überführt und fotokopiert. Anschließend wurde die Membran zunächst für 20 min in Blockingpuffer inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Danach folgte die einstündige Inkubation der Membran mit dem entsprechend verdünnten Erstantikörper in Blockingpuffer, dreimaliges Waschen von jeweils 5 min in TBST und schließlich die Inkubation mit dem Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper in Blockingpuffer für 45 min. Nach viermaligem Waschen für jeweils 5 min wurde die Peroxidaseaktivität durch Zugabe von ECL-Reagenz (Pierce, Bonn) und Detektion der entstehenden Chemilumineszenz mittels Röntgenfilm visualisiert.

3.4.4 Metabolische Markierung und Aufreinigung von 6xHis-markierten Proteinen aus *Xenopus laevis* Oozyten

Die metabolische Markierung erfolgte nach dem von Nicke und Kollegen (1998) beschriebenen Protokoll (Nicke et al., 1998). Nach Injektion von 50 nl entsprechender cRNA (500 ng/ μl) wurden die Oozyten über Nacht bei 19°C in L- ^{35}S]Methionin haltigem ND96 inkubiert, wobei $\sim 0,4 \text{ MBq/Oozyte}$ und 6-8 Oozyten/Ansatz eingesetzt wurden. Am nächsten Tag wurden die Oozyten 3-4x in frischem ND96 gewaschen. Nach vollständiger Abnahme des Überstandes wurden pro Oozyte 20 μl Oozytenpuffer A hinzugegeben und die Oozyten durch 10-20x Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Anschließend wurde 15 min auf Eis solubilisiert, wobei dazwischen mehrmals gevortext wurde. Nach Zentrifugation bei 10.000 g, 4°C für 10 min wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die Zentrifugation wurde wiederholt. Für die Bindung an Ni^+ -NTA-Agarosebeads (Qiagen, Hilden) wurden diese zunächst 3x mit Oozytenpuffer B gewaschen. Bindungsansatz:

100 μl Homogenat

400 μl Oozytenpuffer B

30 μl Ni-NTA-Agarosebeads

5 μl 1M Imidazol pH 8,0

Der Bindungsansatz wurde 30 min unter Schütteln bei 4°C inkubiert, anschließend 1 Minute bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert und in 1 ml Oozytenpuffer C resuspendiert. Das Waschen wurde insgesamt 4x wiederholt, wobei dazwischen zentrifugiert wurde. Die Elution erfolgte in 2x 50 µl Elutionspuffer bei RT und ständigem Schütteln für 30 min.

3.4.5 Glykosylierungsanalyse mit EndoH und PNGase F

Für die Analyse des Glykosylierungszustandes des GlyRs wurden jeweils 10 µl Aliquots des gereinigten Proteins mit der entsprechenden Menge reduzierenden 5x SDS Probenpuffer versetzt und durch Verdünnung der 10% Stocklösung auf 1% Octylglucosid eingestellt. Das Protein EndoH wurde 1:10 in ddH₂O vor dem Gebrauch verdünnt, so dass pro Aliquot 50 U EndoH und 50 U an PNGase F (ohne vorherige Verdünnung) eingesetzt wurden. Die Mischung wurde dann 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend der SDS-PAGE unterzogen (Buttner et al., 2001, Maley et al., 1989).

3.4.6 „Blue native“-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)

Die BN-PAGE ist eine Methode, mit der man Proteine im nativen Zustand elektrophoretisch trennen kann. Anstatt von SDS, das zur Proteindenaturierung führt, wird der Proteinfarbstoff Coomassie G-250 zur Maskierung der Proteinladung verwendet (Schagger et al., 1994). In dieser Arbeit wurde das Protokoll von Schrägger und von Jagow (1994) mit folgenden Modifikationen verwendet: 10 µl Probe wurden mit 2,5 µl 5x nativen Probenpuffer gemischt. Es wurden 1 mm dicke Gele bestehend aus einem linearen Acrylamidgradienten (4-10% oder 4-13%) mittels eines Zweikammer-gradientenmischers gegossen. Um eine bessere Auflösung der Banden zu erreichen, wurden die Trenngele mit einem 4% Sammelgel überschichtet und das Gel mit den Proben und dem nativen Proteinmarker beladen. Die Gele wurden nach folgendem Pippetierschema gegossen, wobei je nach Apparatur das Volumen beider Trenngele schwankte.

Trenngel für Phase-Apparatur

| 3,92 ml/Gel | 4% | 10% | 13% |
|-----------------------------------|-----------|------------|------------|
| H₂O | 2,2 ml | 0,84 ml | 0,6 ml |
| 3x Gelpuffer | 1,33 ml | 1,33 ml | 1,33 ml |
| Glycerin | - | 0,7 ml | 0,7 ml |
| 30% Acrylamid/Bis (37,5:1) | 0,39 ml | 1,33 ml | 1,75 ml |
| 10% APS | 20 µl | 20 µl | 20 µl |
| TEMED | 4 µl | 4 µl | 4 µl |

Sammelgel für Phase-Apparatur

| | 4% |
|-----------------------------------|-----------|
| H₂O | 2,64 ml |
| 3x Gelpuffer | 1,67 ml |
| 30% Acrylamid/Bis (37,5:1) | 0,66 ml |
| 10% APS | 60 µl |
| TEMED | 10 µl |

Das Gel wurde bei einer konstanten Spannung von 120 V ungefähr 2 Stunden laufen gelassen, wobei das von Schrägger und von Jagow (1988) beschriebene Puffersystem mit Anodenpuffer und Kathodenpuffer A, der 0,005% Serva Blue G enthielt, verwendet wurde (Schagger et al., 1988).

4. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Ligandenbindungs determinanten des homooligomeren $\alpha 1$ sowie des heterooligomeren $\alpha 1\beta$ Glycinrezeptors (GlyRs) zu identifizieren. Da es sich beim GlyR um ein membranständiges Protein handelt, stehen bisher keine Informationen über die Struktur des Rezeptors zur Verfügung. Deshalb wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Modell der N-terminalen, ligandenbindenden Domäne der $\alpha 1$ - und der β -Untereinheit entwickelt. Dieses Modell basiert auf der Kristallstruktur des Acetylcholin-Bindeproteins (AChBP) (Brejc et al., 2001), einem löslichen Protein, das Homologie zur N-terminalen Domäne des GlyRs hat. In der vorliegenden Struktur ist der Ligand an der Kontaktstelle zwischen zwei Untereinheiten gebunden (Celie et al., 2004, Brejc et al., 2001). Mit Hilfe dieses Modells konnten zunächst mehrere geladene, aromatische sowie polare Aminosäurereste im homooligomeren $\alpha 1$ -GlyR als Kandidaten für die Bindung des Liganden vorgeschlagen werden. Zur Verifizierung der Rolle dieser Reste in der Ligandenbindung wurden diese mittels PCR-Mutagenese zu Alanin oder zusätzlich auch isofunktionell substituiert. Nach Expression der GlyRs in *Xenopus laevis* Oozyten, wurden die Wildtyp- sowie mutierten Rezeptoren pharmakologisch charakterisiert. Hierzu wurden die Agonisten Glycin und Taurin, der Antagonist Strychnin sowie der Modulator 3α -(3'-Methoxybenzoyloxy)nortropan (MBN) benutzt. Zunächst wurde untersucht, ob es Unterschiede in der Wechselwirkung des vollen Agonisten Glycin und des partiellen Agonisten Taurin mit den substituierten Aminosäureresten in der Bindungstasche der $\alpha 1$ -Untereinheit gibt. Dann sollte analysiert werden, in wiefern Unterschiede in der Bindung des Agonisten und des Antagonisten am homooligomeren $\alpha 1$ -GlyR vorliegen. Des weiteren sollte die Wirkung des Modulators MBN am $\alpha 1$ -Homooligomer näher charakterisiert werden. Anschließend wurde sowohl die Bindung des Agonisten als auch die des Antagonisten zwischen dem homooligomeren $\alpha 1$ und dem heterooligomeren $\alpha 1\beta$ GlyRs verglichen.

4.1 Ligandenbindung am homooligomeren $\alpha 1$ -GlyR

4.1.1 Bindung von Glycin an das $\alpha 1$ -Homooligomer

Zur Identifizierung der Aminosäurereste, die an der Bindung des Agonisten Glycin in der $\alpha 1$ -Bindungstasche beteiligt sind, wurden Mutationen in die $\alpha 1$ -cDNA mittels PCR-Mutagenese eingeführt. Die Verifizierung der Mutationen erfolgte durch Sequenzierung. Anschließend wurde die cRNA der entsprechenden Mutanten *in vitro* mit dem mCAP RNA Capping Kit (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) synthetisiert. Nach Quantifizierung der cRNA mittels Agarosegelelektrophorese sowie photometrischer Konzentrationsbestimmung wurde die cRNA i.d.R. auf eine Konzentration von 200 ng/ μ l eingestellt und zur Bestimmung der pharmakologischen Eigenschaften des mutierten $\alpha 1$ -GlyRs in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert. Nach Inkubation der Oozyten über Nacht bei 19°C folgte die elektrophysiologische Charakterisierung im Zwei-Elektroden Spannungsklemm-Modus, indem zunehmende Glycinkonzentrationen appliziert und Dosiswirkungskurven aufgezeichnet wurden.

So wurden bereits während meiner Diplomarbeit wichtige Aminosäurereste in der $\alpha 1$ -Untereinheit des GlyRs identifiziert (Tab. 4.1, Abb. 4.1A), die für die Bindung des Agonisten Glycin essentiell sind. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass für die Glycinbindung an der Kontaktstelle zwischen zwei benachbarten N-terminalen Domänen geladene und aromatische Aminosäureseitenketten für die Stabilisierung des Liganden verantwortlich sind. Die Substitution der Reste $\alpha 1$ F63A, $\alpha 1$ R65A auf der (-)Seite sowie $\alpha 1$ E157D und $\alpha 1$ F207A auf der (+)Seite führte zur 1300-fachen Reduktion der apparenten Affinität für Glycin (Tab. 4.1) und bestätigte, dass diese Aminosäureseitenketten essentiell für die Glycinbindung sind. Zusätzlich wurde bei den beiden zuletztgenannten Substitutionen eine signifikante Abnahme des Maximalstromes beobachtet. An dieser Stelle sollte aber erwähnt werden, dass bei beiden Mutationen der EC₅₀-Wert aufgrund fehlender Stromsättigung auch bei hohen Agonistenkonzentrationen nur abgeschätzt werden konnte, d.h. der gemessene, scheinbare I_{max} muss nicht dem tatsächlichen Maximalstrom entsprechen.

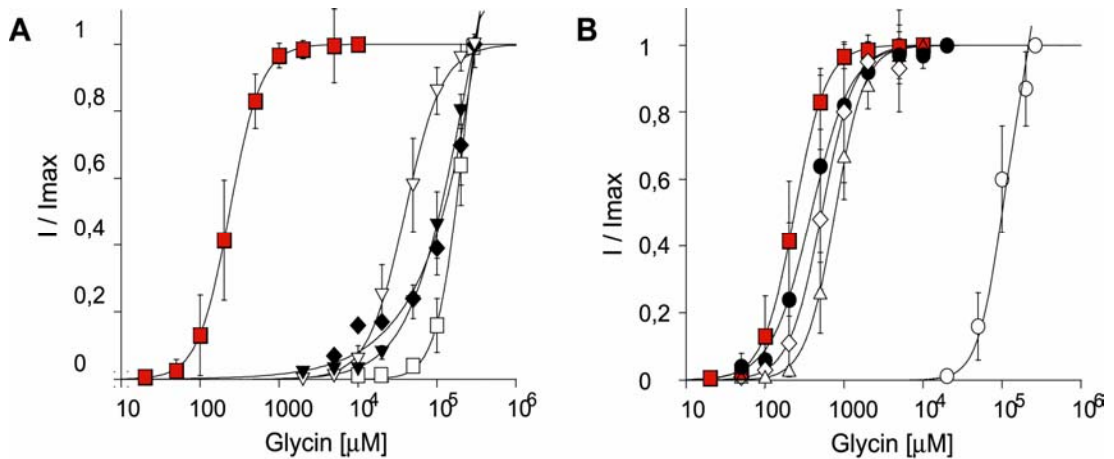


Abb. 4.1 Dosiswirkungskurven des Agonisten Glycin. **A.** Dosiswirkungskurven der bereits während meiner Diplomarbeit identifizierten, an der Glycinbindung beteiligten Aminosäurereste der $\alpha 1$ -Untereinheit. Dargestellt sind Dosiswirkungskurven des Wildtyps (■) und der Substitutionen $\alpha 1F63A$ (□), $\alpha 1R65A$ (▼) und K (▽) sowie $\alpha 1E157D$ (◆). **B.** Dosiswirkungskurven des Wildtyps (■) und der neu eingeführten $\alpha 1$ -Mutationen $\alpha 1E172A$ (●) $\alpha 1D180A$ (◇), $\alpha 1K200A$ (○) und $\alpha 1N203A$ (△). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Um weitere an der Ligandenbindung beteiligte Seitenketten zu identifizieren, wurden folgende Reste der $\alpha 1$ -Untereinheit zu Alanin ausgetauscht: $\alpha 1E172$, $\alpha 1D180$, $\alpha 1K200$, $\alpha 1Y202$, und $\alpha 1N203$. Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Substitutionen $\alpha 1K200A$ und $\alpha 1Y202L$ einen großen Einfluss auf die apparente Glycinaffinität haben (Rajendra et al., 1995b). Jedoch erfolgte die Charakterisierung der mutierten GlyRs nach Expression in HEK293-Zellen und nicht in *Xenopus* Oozyten. Da es in verschiedenen Expressionssystemen zu unterschiedlichen Auswirkungen von Mutationen auf die apparente Affinität des homooligomeren GlyRs kommen kann (Kung et al., 2001) und außerdem in den folgenden Abschnitten Alaninsubstitutionen zwischen Homo- und Heterooligomer direkt verglichen werden, wurden diese beiden Reste zu Alanin mutiert und nach Expression in *Xenopus* Oozyten pharmakologisch charakterisiert. Die Aufnahme von Dosiswirkungskurven des Agonisten Glycin an den oben genannten Mutanten zeigte, dass die eingeführten Substitutionen unterschiedliche Auswirkungen auf die apparente Glycinaffinität des Rezeptors haben (Tab. 4.1). Während der Austausch der Reste $\alpha 1E172A$, $\alpha 1D180A$ und $\alpha 1N203A$ nur zu einer 2-4-fachen Zunahme des EC_{50} -Wertes von Glycin führte, zeigte die Mutation $\alpha 1K200A$ wie erwartet einen starken Einfluss auf die apparente Affinität ($EC_{50} \geq 250$ mM) von Glycin. In diesem Fall konnte der Wert nur abgeschätzt werden, da auch bei einer sehr hohen Glycinkonzentration von ≤ 300 mM eine Sättigung der

Stromantwort nicht erreicht wurde. Die Mutation $\alpha 1Y202A$ resultierte in einem nicht funktionellen Rezeptor. Zusammenfassend kann man sagen, dass neben den bereits identifizierten Aminosäureresten $\alpha 1F63$, $\alpha 1R65$, $\alpha 1E157$ und $\alpha 1F207$ eine weitere Aminosäureseitenkette, $\alpha 1K200$, eine essentielle Rolle bei der Bindung des Agonisten Glycin hat.

Tab. 4.1 Agonistenbindung am homooligomeren $\alpha 1$ -GlyR.

| injizierte cRNA | Glycin | | | Taurin | |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|----------------|---------------------------|--|
| | EC ₅₀ [mM] (n) | I _{max} /mV [μ A] | n _H | EC ₅₀ [mM] (n) | $\frac{I_{\max \text{tau}}}{I_{\max \text{gly}}} (\%)$ |
| $\alpha 1$ wt | 0,19 \pm 0,05 (12) | 160 \pm 100 | 2,4 \pm 0,8 | 3,6 \pm 1,6 (10) | 25 \pm 9 |
| $\alpha 1F63A^{\dagger}$ | $\geq 250^*$ (6) | 110 \pm 80 | NB | $\geq 300^*$ (4) | 20 \pm 5 |
| $\alpha 1R65K^{\dagger}$ | 41 \pm 12* (5) | 100 \pm 70 | 2,0 \pm 0,3 | 58 \pm 21* (5) | 54 \pm 7* |
| $\alpha 1R65A^{\dagger}$ | $\geq 250^*$ (4) | 110 \pm 20 | 2,2 \pm 0,4 | 84 \pm 20* (6) | 83 \pm 19* |
| $\alpha 1R119K^{\dagger}$ | 11 \pm 4* (7) | 50 \pm 60 | 1,8 \pm 0,3 | 25 \pm 19* (7) | 37 \pm 15 |
| $\alpha 1R119A^{\dagger}$ | 27 \pm 12* (5) | 70 \pm 60 | 1,9 \pm 0,1 | 67 \pm 29* (7) | 7 \pm 1* |
| $\alpha 1R131K^{\dagger}$ | 2,3 \pm 1,7* (5) | 100 \pm 70 | 0,9 \pm 0,2* | 3,6 \pm 1,8 (5) | 57 \pm 16* |
| $\alpha 1R131A^{\dagger}$ | 0,11 \pm 0,09 (8) | 90 \pm 40 | 1,6 \pm 0,4 | 0,42 \pm 0,16* (6) | 65 \pm 10* |
| $\alpha 1Q155A^{\dagger}$ | 2,5 \pm 0,9* (9) | 70 \pm 60 | 1,5 \pm 0,3* | 26 \pm 5* (5) | 26 \pm 15 |
| $\alpha 1E157D^{\dagger}$ | $\geq 250^*$ (5) | < 10* | NB | $\geq 300^*$ (5) | 96 \pm 6* |
| $\alpha 1E172A$ | 0,46 \pm 0,33 (7) | 45 \pm 30 | 1,9 \pm 0,6 | 6,9 \pm 0,9* (8) | 31 \pm 11 |
| $\alpha 1D180A$ | 0,49 \pm 0,28* (7) | 100 \pm 70 | 2,4 \pm 0,4 | 6,0 \pm 1,2 (5) | 30 \pm 11 |
| $\alpha 1Y197A^{\dagger}$ | 0,45 \pm 0,14* (6) | 60 \pm 30 | 2,0 \pm 0,9 | 4,9 \pm 2,9 (5) | 31 \pm 17 |
| $\alpha 1K200A$ | $\geq 250^*$ (5) | 85 \pm 53 | NB | NB | - |
| $\alpha 1Y202A$ | NF | - | - | - | - |
| $\alpha 1N203A$ | 0,83 \pm 0,21* (8) | 100 \pm 60 | 2,5 \pm 0,5 | 5,7 \pm 1,7 (6) | 42 \pm 21 |
| $\alpha 1F207A^{\dagger}$ | $\geq 250^*$ (8) | 10 \pm 10 * | 1,7 \pm 0,5 | NB | NB |
| $\alpha 1T208A^{\dagger}$ | 0,69 \pm 0,25* (8) | 70 \pm 30 | 1,7 \pm 0,3 | 5,7 \pm 1,5 (4) | 58 \pm 15* |

Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). Werte, die im Vergleich zum Wildtyprezeptor signifikant unterschiedlich sind ($p < 0,01$; Student's T-Test) sind durch einen Stern (*) markiert. Der durch die Applikation des vollen Agonisten Glycin gemessene Maximalstrom wurde jeweils auf das Haltepotential normiert. Werte, die mit \dagger markiert sind wurden bereits während der Diplomarbeit ermittelt. n: Anzahl der Messungen; NB: nicht bestimmt; NF: nicht funktionell.

4.1.1.1 Auswirkung der $\alpha 1$ -Mutationen auf die Assemblierung des GlyRs

Vergleicht man die Maximalströme aller Mutanten mit dem Wildtyp $\alpha 1$ -GlyR (Tab. 4.1), so kann man feststellen, dass nur in zwei Fällen, nämlich bei den Mutationen $\alpha 1E157D$ und $\alpha 1F207A$, eine signifikante Abnahme des Maximalstromes beobachtbar ist. Alle anderen Substitutionen hingegen zeigen einen unveränderten Stromfluss gegenüber dem Wildtyprezeptor. Die Reduktion des Stromflusses der beiden Mutationen kann durch mehrere Ursachen begründet sein. Zum einen können diese Reste eine essentielle Rolle in der Ligandenbindung haben. Zum anderen können sie sich auf die Faltung der Untereinheit und damit auf die Assemblierung zum Pentamer negativ auswirken. Um festzustellen in wieweit die eingeführten Mutationen die Assemblierung des Rezeptors beeinflussen, wurden sowohl die Wildtyp $\alpha 1$ - als auch die beiden mutierten $\alpha 1E157D$ - und $\alpha 1F207A$ -Untereinheiten in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Nach metabolischer Markierung mit radioaktiv markiertem [^{35}S]Methionin für 24-48h folgte eine Inkubation mit nicht markiertem Methionin gefolgt von einer anschließenden Aufreinigung des Rezeptors mittels des C-terminal lokalisierten 6xHis-Tags über Ni^{++} -NTA Agarose Beads. Die Aufreinigung erfolgte unter nativen Bedingungen, d.h. ohne die Zugabe von reduzierenden oder denaturierenden Agenzien. Anschließend wurden die Proben der BN-PAGE unterzogen und die Radioaktivität in den entsprechenden Banden mittels Auflegen eines autoradiographischen Films detektiert. Um zu zeigen, dass es sich bei den vorhandenen Banden tatsächlich um pentamere Komplexe handelt, wurden die Proben zusätzlich in 1% SDS inkubiert, was in einem Zerfall des Pentamers in Tetra-, Tri-, Di- und Monomere resultieren sollte.

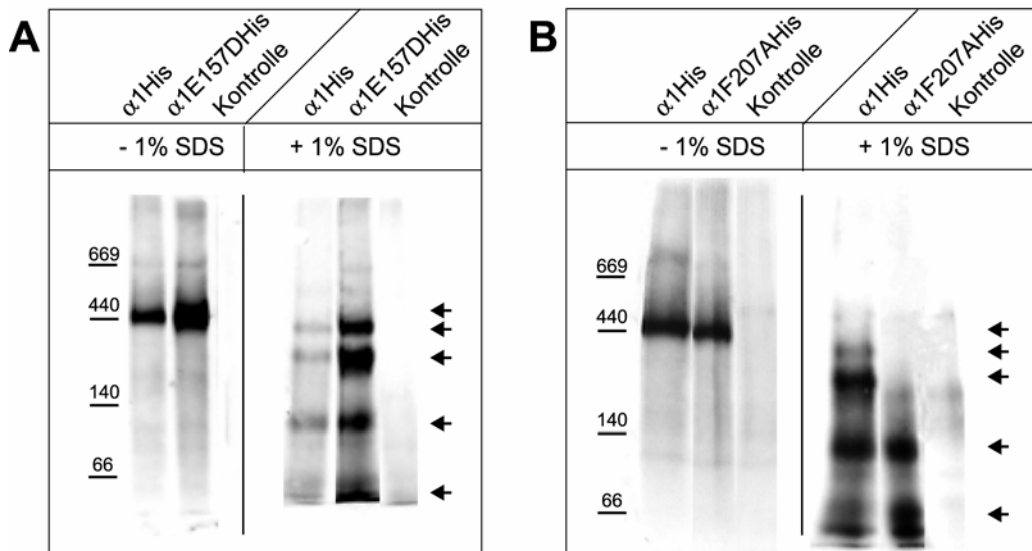


Abb. 4.2 Auswirkung der $\alpha 1$ -Mutationen auf die Assemblierung des Rezeptors. Die Untereinheiten wurden nach Injektion der cRNA in *Xenopus* Oozyten einer metabolischen Markierung mit [^{35}S]Methionin unterzogen, anschließend mittels Ni^{2+} -NTA Agarose über den C-terminal lokalisierten 6xHis-Tag aufgereinigt und entsprechend mit oder ohne Behandlung mit 1% SDS der BN-PAGE (4-13%) unterzogen. **A.** Natives Gel des $\alpha 1$ -Wildtyps und der Probe $\alpha 1\text{E}157\text{D}$ mit und ohne SDS-Behandlung. **B.** Natives Gel des $\alpha 1$ -Wildtyps sowie der Mutante $\alpha 1\text{F}207\text{A}$. In beiden Fällen (A+B) wurden als Kontrolle nicht injizierte Oozyten verwendet. Die Pfeile deuten die verschiedenen Assemblierungszustände an, von oben nach unten: Penta-, Tetra-, Tri-, Di- und Monomere. Das Molekulargewicht der Markerbanden ist in kD angegeben.

Die in Abbildung 4.2 A+B dargestellten nativen Gele zeigen, dass der Wildtyprezeptor sowie beide Mutanten in der Lage sind, effizient Pentamere zu bilden, da in allen drei Fällen unter nativen Bedingungen eine einzige hochmolekulare Bande präsent ist. Diese Bande läuft in Höhe der Markerbande des Proteins Ferritin (440 kD). Allerdings wurden die Gele nicht bis zur Einstellung des Gleichgewichts laufen gelassen, d.h. das Molekulargewicht der Markerbande kann nicht mit dem Molekulargewicht korreliert werden. Wie erwartet zerfallen die $\alpha 1$ - und $\alpha 1\text{E}157\text{D}$ -Pentamere nach Behandlung mit 1% SDS in Komplexe mit niederem Untereinheitengehalt, d.h. in Tetra-, Tri-, Di- und Monomere, während die Pentamere der $\alpha 1\text{F}207\text{A}$ vorwiegend als Di- und Monomeren vorliegen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die eingeführten Mutationen keine Auswirkung auf die effiziente Assemblierung der Untereinheiten zum Pentamer haben.

4.1.1.2 Auswirkung der $\alpha 1$ Mutationen auf die Glykosylierung des Rezeptors

Neben dem Einfluss auf die Rezeptorassemblierung können sich Mutationen auf die Faltung der Untereinheiten und damit auch auf den Transport und die Zelloberfläche auswirken. Ist durch eine Mutation z.B. die Glykosylierung verändert, so kann das zur Folge haben, dass die mutierten Rezeptoren eine andere Lokalisation aufzeigen und anstatt an die Zelloberfläche transportiert zu werden, im ER verbleiben. Die Lokalisation des Rezeptors kann also mit unterschiedlichen Glykosylierungszuständen korreliert werden. Diese können mit den Glykosidasen Endoglycosidase H (EndoH) und der Peptid-N-Glycosidase F (PNGase F) untersucht werden. EndoH ist nur in der Lage mannosereiche Oligosaccharide zu entfernen, die bei ER lokalisierten Proteinen vorhanden sind, während komplexe Oligosaccharide, die im Golgi-Apparat entstehen, gegen den EndoH-Verdau resistent sind. Im Gegensatz dazu entfernt PNGase F unspezifisch alle Oligosaccharide des Proteins (Maley et al., 1989). Um zu untersuchen, ob die eingeführten Mutationen, die nach Expression in einem stark reduzierten Stromfluss resultieren, die Glykosylierung des Rezeptors verändern, wurden die Wildtyp- sowie die $\alpha 1E157D$ - und $\alpha 1F207A$ -Untereinheiten wie im Abschnitt 4.1.1.1 beschrieben, metabolisch markiert und unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Es folgte die Inkubation mit EndoH oder PNGase F unter nativen Bedingungen, um zu schauen, in wieweit beide Enzyme in der Lage sind, die Oligosaccharide zu entfernen. Anschließend wurde die Proben der SDS-PAGE unterzogen und die Radioaktivität in den Banden durch Auflegen eines autoradiographischen Filmes visualisiert.

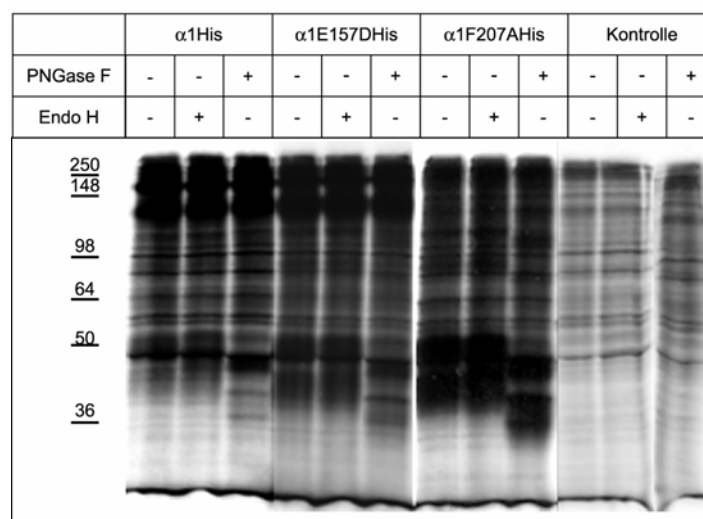


Abb. 4.3 Auswirkung der $\alpha 1$ -Mutationen auf die Glykosylierung des Rezeptors. Die cRNA der entsprechenden Untereinheiten wurde in *Xenopus* Oozyten injiziert, diese wurden mit [35 S]Methionin metabolisch markiert und anschließend wurden die Rezeptoren mittels Ni^{+} -NTA Agarose über den C-

terminal lokalisierten 6xHis-Tag aufgereinigt. Nach entsprechender Behandlung mit EndoH oder PNGase F wurden die Proben der SDS-PAGE (9%) unterzogen. Es wurden folgende Proben aufgereinigt: $\alpha 1$, $\alpha 1E157D$, $\alpha 1F207A$ sowie nicht injizierte Oozyten als Kontrolle. Die beiden Pfeile auf der rechten Seite deuten die glykosylierten sowie deglykosylierten Banden der nicht prozessierten $\alpha 1$ -Untereinheiten an, während die beiden Pfeilspitzen die glykosylierten und deglykosylierten prozessierten $\alpha 1$ -Untereinheiten markieren. Das Molekulargewicht der Markerbanden ist in kD angegeben.

In Abbildung 4.3 ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die Wildtyp $\alpha 1$ -Untereinheit als auch die Mutanten $\alpha 1E157D$ und $\alpha 1F207A$ resistent gegenüber dem Verdau mit EndoH sind, d.h. es ist keine Reduktion im Molekulargewicht der 48 kD Bande zu erkennen. Im Gegensatz dazu sind alle untersuchten Untereinheiten sensitiv gegenüber der Behandlung mit PNGase F, d.h. bei allen drei Untereinheiten ist eine Reduktion im Molekulargewicht zu erkennen, was der Entfernung einer komplexen Glykosylierung der $\alpha 1$ -Untereinheit entspricht. Es ist zu beachten, dass gerade bei den beiden Mutanten $\alpha 1E157D$ und $\alpha 1F207A$ ein Abbauprodukt von 35 kD zu beobachten ist (angedeutet durch die obere Pfeilspitze). Die proteolytische Spaltung der $\alpha 1$ -Untereinheit in ein 35- und 13 kD-Fragment wurde bereits in früheren Untersuchungen beschrieben (Buttner et al., 2001). Die Prozessierung erfolgt innerhalb der intrazellulären M3M4-Schleife nach Internalisierung des zuvor an der Zelloberfläche lokalisierten Rezeptors. Das 13 kD-Fragment wird aufgrund der gewählten Auflösung des SDS-Geles von der Lauffront überlagert und ist nicht zu erkennen. Das 35 kD-Spaltprodukt, das die N-terminale Domäne und damit die Glykosylierungsstelle beinhaltet, wird nur durch PNGase F, nicht jedoch durch EndoH deglykosyliert. Damit haben die eingeführten Mutationen keine Auswirkung auf den Glykosylierungszustand der Untereinheiten. Dieses Ergebnis unterstützt den wichtigen Beitrag beider Reste zur Bindung des Liganden.

4.1.2 Bindung des partiellen Agonisten Taurin an die $\alpha 1$ -Untereinheit

Neben dem vollen Agonisten Glycin wurde auch die apparente Affinität des partiellen Agonisten Taurin am Wildtyp- sowie an den mutierten Rezeptoren bestimmt. Die Mutationen $\alpha 1H201A$ und $\alpha 1F207A$ wurden von dieser Untersuchung ausgeschlossen, weil die erstgenannte Substitution keine Auswirkung auf die Glycinaffinität hatte und die letztere in einem stark reduzierten Stromfluss resultierte. In diesem Experiment sollte festgestellt werden, in wieweit beide

Agonisten mit den gleichen Aminosäureresten der $\alpha 1$ -Bindungstasche interagieren. Dazu wurden Dosiswirkungskurven des partiellen Agonisten Taurin aufgenommen. Alle Mutationen, die zu einer Abnahme der apparenten Affinität des vollen Agonisten Glycin führten, zeigten auch einen erhöhten EC_{50} -Wert für den partiellen Agonisten Taurin (Tab. 4.1), jedoch waren die Verschiebungen insgesamt weniger stark ausgeprägt im Vergleich zum Glycin. Als einzige Ausnahme ist die $\alpha 1R131K$ Substitution anzumerken, denn in diesem Fall ist zwar die apparente Glycinaffinität 12-fach reduziert, doch eine Veränderung in der Taurinaffinität ist nicht zu beobachten. Die höchste Abnahme in der apparenten Affinität von Taurin wurde bei den Substitutionen $\alpha 1F63$ und $\alpha 1E157$ beobachtet. Bei diesen beiden Mutationen konnte der EC_{50} -Wert nur geschätzt werden, da auch bei hohen Taurinkonzentrationen (≤ 300 mM) eine Sättigung der Stromantwort nicht erreicht wurde. Auch die Austausche $\alpha 1R65K$ und A führten zur starken Reduktion der apparenten Taurinaffinität (16- und 23-fach) (Abb. 4.4). Keine signifikante Veränderung wurde ähnlich wie bei Glycin bei folgenden Mutationen beobachtet: $\alpha 1R131K$, $\alpha 1E172A$, $\alpha 1D180A$, $\alpha 1Y197A$, $\alpha 1N203A$ und $\alpha 1T208A$. Im Gegensatz dazu wurde bei der Substitution $\alpha 1R131A$ eine 10-fache Zunahme in der apparenten Affinität von Taurin beobachtet. Zwar war eine leichte Abnahme im EC_{50} -Wert für Glycin beobachtet worden, jedoch ist diese Substitution die einzige, die eine stärkere Auswirkung auf die apparente Affinität von Taurin zeigt als auf die von Glycin. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Substitution von geladenen und aromatischen Resten eine ähnliche Auswirkung auf die Affinität des partiellen Agonisten Taurin hat wie auf die des vollen Agonisten Glycin.

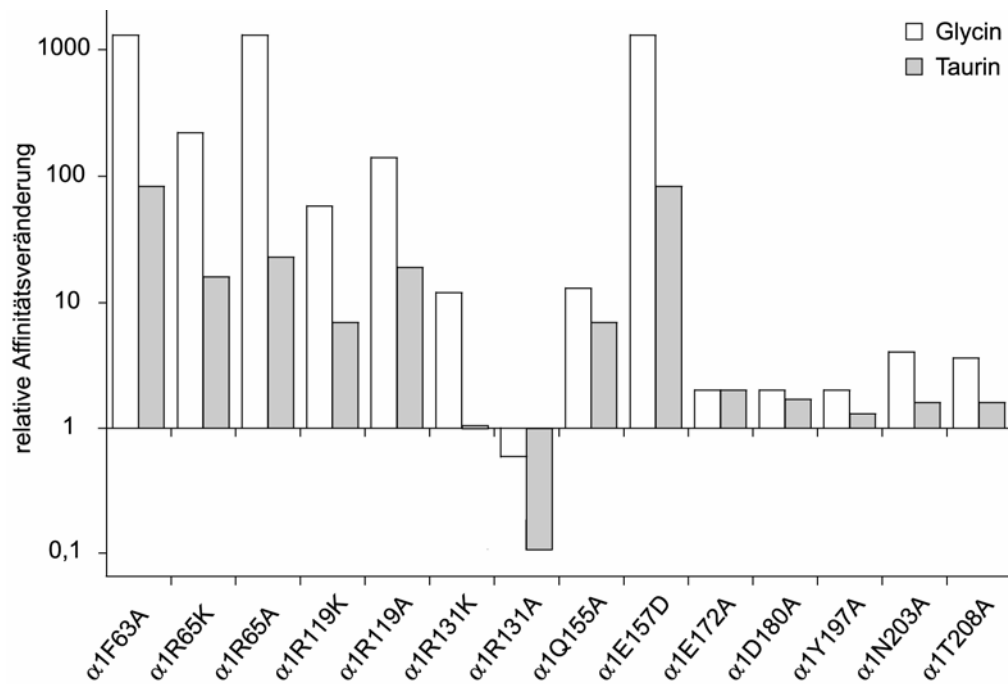


Abb. 4.4 Veränderung der apparenten Affinität von Taurin im Vergleich zu Glycin. Es wurden Dosiswirkungskurven des vollen Agonisten Glycin und des partiellen Agonisten Taurin für alle Mutationen aufgenommen und die relativen Veränderungen im EC_{50} -Wert für beide Agonisten gegenüber dem Wildtyprezeptor graphisch aufgetragen. Alle Mutationen, die die Glycinaffinität reduzieren zeigen auch eine Zunahme im EC_{50} -Wert für Taurin. Eine Ausnahme bildet $\alpha 1R131K$, die in einer reduzierten Glycin-, aber in einer unveränderten Taurinaffinität resultiert. Die Substitution $\alpha 1R131A$ zeigt als einzige eine Affinitätszunahme von Glycin und Taurin im Vergleich zum Wildtyp.

Die Aktivierungseffizienz des partiellen Agonisten Taurin ist im Vergleich zum vollen Agonisten Glycin geringer und liegt bei 20-30%. Basierend auf dem von D. Colquhoun postuliertem Modell der Unabhängigkeit von Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung (Colquhoun, 1998), sollten Veränderungen im Aktivierungsvorgang einerseits in einer Reduktion des Maximalstroms und andererseits in einer geringeren Aktivierungseffizienz eines partiellen Agonisten resultieren. Um zu untersuchen, ob die eingeführten Substitutionen in der $\alpha 1$ -Untereinheit lediglich die Ligandenbindung oder auch die Aktivierung des Rezeptors beeinflussen, wurde durch sequenzielle Applikation von sättigenden Konzentrationen des partiellen Agonisten Taurin und des vollen Agonisten Glycin die Aktivierungseffizienz von Taurin bestimmt. Interessanterweise hat nur die Substitution $\alpha 1R119A$ von insgesamt 14 untersuchten Mutationen die Aktivierungseffizienz von Taurin gegenüber Glycin reduziert (Abb. 4.5). Ansonsten zeigten alle anderen Substitutionen entweder eine gleiche oder erhöhte Aktivierungseffizienz für Taurin. Die höchste Zunahme in der Aktivierungseffizienz

ist für die Substitutionen $\alpha 1R65A$ ($84 \pm 20\%$) und $\alpha 1E157D$ ($96 \pm 6\%$) zu beobachten. Im Fall der $\alpha 1E157D$ wird Taurin zum vollen Agonisten, da diese Mutationen annähernd die gleiche Aktivierungseffizienz aufzeigt wie Glycin. Da nur im Fall der $\alpha 1R119A$ eine signifikante Reduktion des Maximalstromes beobachtet wurde, kann nach den theoretischen Überlegungen von Colquhoun (1998) (siehe Abschnitt 1.3.2) gefolgert werden, dass die eingeführten Mutationen hauptsächlich die Bindungs- und weniger die Aktivierungseigenschaften des Rezeptors beeinflussen.

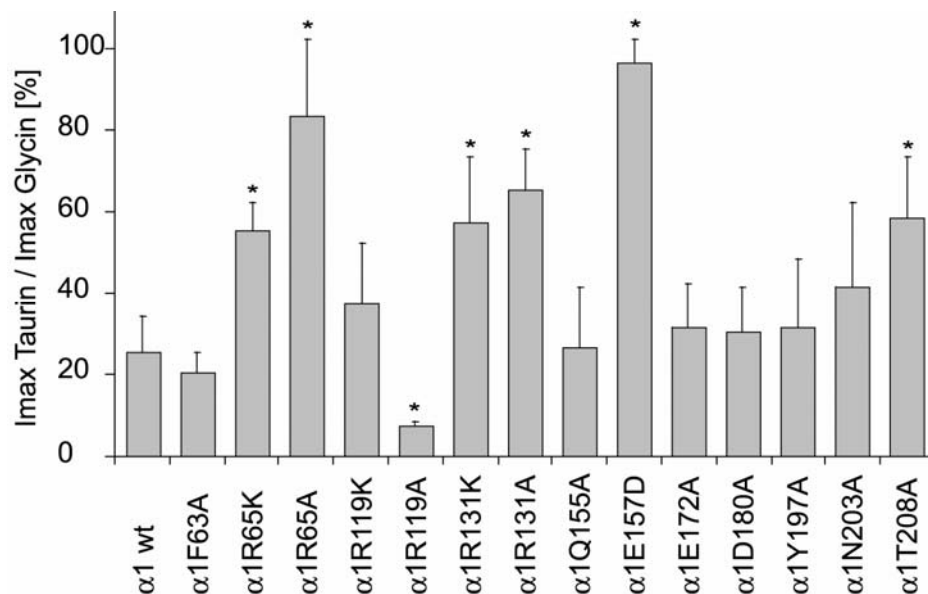


Abb. 4.5 Taurineffizienz am homooligomeren $\alpha 1$ -GlyR. Die Effizienz des partiellen Agonisten Taurin im Vergleich zum vollen Agonisten Glycin wurde durch Applikation der entsprechend sättigenden Konzentrationen beider Agonisten bestimmt. Signifikante Änderungen gegenüber dem $\alpha 1$ -Wildtyprezeptor sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet ($p < 0,01$; Student's T-Test). Die Substitutionen $\alpha 1R65K$ und A, $\alpha 1R131K$ und A, $\alpha 1E157D$ sowie $\alpha 1T208A$ zeigen eine erhöhte, während die Mutation $\alpha 1R119A$ als einzige eine signifikante Reduktion der Taurinaktivierungseffizienz aufweist. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt.

4.1.3 Strychninbindung am homooligomeren $\alpha 1$ -GlyR

Das Pflanzenalkaloid Strychnin ist ein potenter Antagonist am GlyR mit einer Affinität im nanomolaren Bereich ($IC_{50} = 36 \pm 10$ nM). Um zu testen, in wieweit die in der $\alpha 1$ -Untereinheit eingeführten Substitutionen auch die Bindung des Antagonisten verändern, wurden bereits in meiner Diplomarbeit Inhibierungskurven des Antagonisten Strychnin aufgenommen. Dazu wurden zunehmende Strychninkonzentrationen mit der jeweiligen EC_{50} -Glycinkonzentration gemischt und koappliziert.

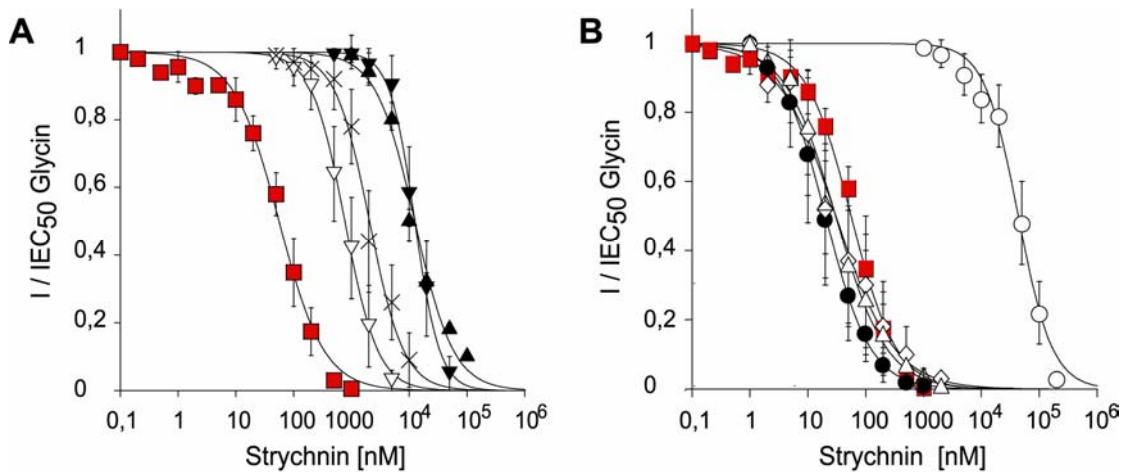


Abb. 4.6 Inhibierungskurven des Antagonisten Strychnin. **A.** Inhibierungskurven der wichtigsten, bereits während meiner Diplomarbeit identifizierten, strychninbindenden Aminosäurereste der $\alpha 1$ -Untereinheit. Dargestellt sind Inhibierungskurven des Wildtyps (■) und der Substitutionen $\alpha 1F63A$ (▲), $\alpha 1R131A$ (▼) und K (▽) sowie $\alpha 1T208A$ (×). **B.** Strychnininhibierungskurven des Wildtyps (■) und der neu eingeführten $\alpha 1$ -Mutationen $\alpha 1E172A$ (●), $\alpha 1D180A$ (◇), $\alpha 1K200A$ (○) und $\alpha 1N203A$ (△). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt.

Interessanterweise konnte bereits während meiner Diplomarbeit gezeigt werden, dass für die Bindung von Strychnin z.T. andere Aminosäurereste essentiell sind als für den Agonisten Glycin. Statt der Aminosäureseitenkette $\alpha 1R65$, die für die Glycinbindung essentiell ist, ist für die Stabilisierung von Strychnin ein anderes Arginin, nämlich das $\alpha 1R131$, von großer Bedeutung. Neben diesem Aminosäurerest sind auch $\alpha 1F63A$, $\alpha 1E157$ und $\alpha 1F207$ an der Strychninbindung beteiligt (Abb. 4.6A). Auch mit den neu eingeführten Austausch $\alpha 1E172A$, $\alpha 1D180A$, $\alpha 1K200A$, und $\alpha 1N203A$ wurden Strychnininhibierungskurven aufgenommen. Dabei stellte sich heraus, dass die drei Substitutionen $\alpha 1E172A$, $\alpha 1D180A$ und $\alpha 1N203A$, die bereits keine Auswirkung auf die apparente Affinität von Glycin und Taurin hatten, auch den IC_{50} -Wert von Strychnin nicht beeinflussten (Tab. 4.2 und Abb. 4.6B). Im Gegensatz dazu zeigt die Mutation $\alpha 1K200A$ die stärkste Reduktion der Strychninaffinität (1200-fach). Zusammenfassend kann man folgern, dass neben den bereits identifizierten Aminosäureresten $\alpha 1F63A$, $\alpha 1R131$, $\alpha 1E157D$ und $\alpha 1F207A$ auch $\alpha 1K200$ wichtig für die Antagonistenwirkung ist.

Tab. 4.2 Strychninbindung am homooligomeren $\alpha 1$ -GlyR.

| injizierte cRNA | Strychnin |
|-------------------------------|---------------------------|
| | IC ₅₀ [nM] (n) |
| $\alpha 1$ wt | 36 \pm 10 (9) |
| $\alpha 1$ F63A [†] | 12000 \pm 3000* (5) |
| $\alpha 1$ R65K [†] | 170 \pm 80* (6) |
| $\alpha 1$ R65A [†] | 160 \pm 50* (4) |
| $\alpha 1$ R119K [†] | 130 \pm 70* (6) |
| $\alpha 1$ R119A [†] | 250 \pm 120* (4) |
| $\alpha 1$ R131K [†] | 830 \pm 400* (6) |
| $\alpha 1$ R131A [†] | 13000 \pm 3600* (8) |
| $\alpha 1$ Q155A [†] | 69 \pm 23* (6) |
| $\alpha 1$ E157D [†] | KI (5) |
| $\alpha 1$ E172A | 23 \pm 12 (7) |
| $\alpha 1$ D180A | 26 \pm 15 (7) |
| $\alpha 1$ Y197A [†] | 37 \pm 7 (7) |
| $\alpha 1$ K200A | 44000 \pm 12000 (5) |
| $\alpha 1$ N203A | 32 \pm 18 (7) |
| $\alpha 1$ F207A [†] | KI (4) |
| $\alpha 1$ T208A [†] | 2200 \pm 800* (7) |

Dargestellt sind Mittelwerte \pm (SD). Werte, die im Vergleich zum Wildtyprezeptor (wt) signifikant unterschiedlich sind ($p < 0,01$; Student's T-Test) sind durch einen Stern (*) markiert. Werte, die mit [†] markiert sind, wurden bereits während meiner Diplomarbeit ermittelt. n: Anzahl der Messungen; NF: nicht funktionell; KI: keine Inhibition.

4.1.4 Modulation des homooligomeren GlyRs durch das Tropein MBN

Wie eingangs erwähnt, wirkt das Tropein MBN modulierend am GlyR. Bei geringen Agonistenkonzentrationen ist vorwiegend der potenzierende Effekt beobachtbar, während bei höheren Agonisten- und MBN-Konzentrationen die Inhibition dominiert. Deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, in wieweit die gegensätzlichen Wirkungen von MBN (Inhibition und Potenzierung) durch Mutationen in der Ligandenbindungstasche der $\alpha 1$ -Untereinheit beeinflusst werden.

4.1.4.1 Inhibierende Wirkung von MBN am homooligomeren $\alpha 1$ -GlyR

Die Aufnahme von Inhibierungskurven des Modulators MBN erfolgte an der entsprechenden EC_{50} -Konzentration des Agonisten Glycin. Wie auch beim Strychnin wurde das MBN für ca. 10 Sekunden vorappliziert, um dann mit dem Agonisten koappliziert zu werden. Die Konzentration an MBN wurde so weit gesteigert, bis kein Agonistenstrom mehr zu messen war.

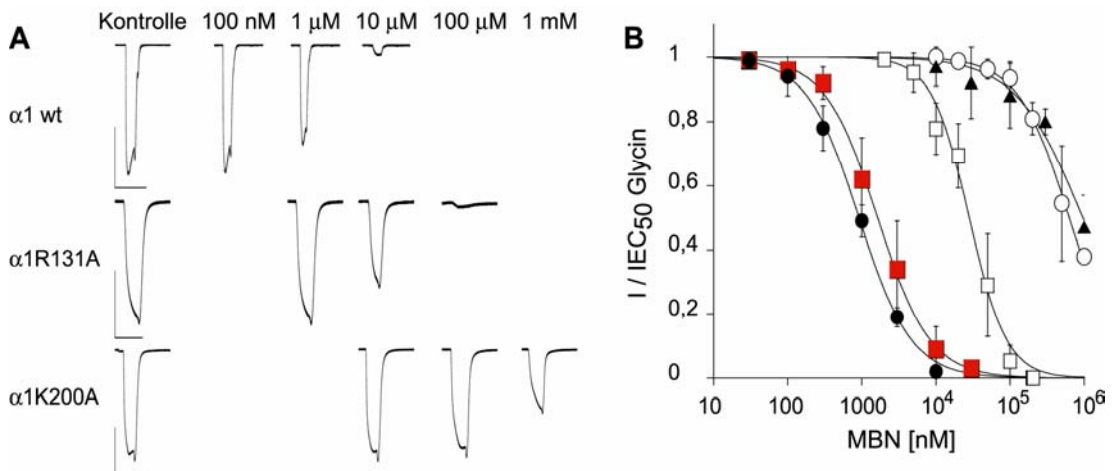


Abb. 4.7 Inhibierende Wirkung des Modulators MBN. **A.** Stromantworten nach Hemmung des Modulators MBN für den $\alpha 1$ -GlyR sowie die Mutationen $\alpha 1R131A$ und $\alpha 1K200A$. Die entsprechenden Ströme wurden durch die Applikation der jeweiligen EC_{50} -Konzentration von Glycin gemessen. Über den Stromantworten ist die verwendete MBN-Konzentration angegeben. Die Längen der Skalierungsbalken entsprechen 40 sec (horizontal) und 2 μ A (vertikal). **B.** Inhibierungskurven aufgenommen für den $\alpha 1$ -Wildtyp (■) sowie die Substitutionen $\alpha 1F63A$ (▲), $\alpha 1R65A$ (●), $\alpha 1R131A$ (□) und $\alpha 1K200A$ (○). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt.

Der IC_{50} -Wert für MBN am Wildtyp $\alpha 1$ -GlyR ist $1,81 \pm 0,81 \mu$ M. Bis auf die Substitution $\alpha 1R65A$, deren IC_{50} -Wert im Vergleich zum Wildtyp unverändert ist, zeigten alle anderen untersuchten Mutationen eine signifikante Reduktion der Affinität des Tropeins MBN (Abb 4.7). So resultierten die Substitutionen $\alpha 1F63A$ und $\alpha 1K200A$ in einem GlyR, der auch durch hohe MBN-Konzentrationen (≤ 1 mM) nicht vollständig gehemmt werden konnte. Die Substitution $\alpha 1R131A$ zeigte ebenfalls einen starken Einfluss auf den IC_{50} -Wert des MBN. In diesem Fall war die Affinität um das 17-fache reduziert, d.h. diese Mutation hatte einen IC_{50} -Wert von $30 \pm 8 \mu$ M. Diese Ergebnisse zeigen, dass für die inhibitorische Wirkung von MBN Reste in der $\alpha 1$ -Ligandenbindungstasche essentiell sind, was einen kompetitiven Wirkungsmechanismus impliziert.

Tab. 4.3 Wirkung des Modulators MBN.

| injizierte cRNA | Inhibierung | Potenzierung |
|---------------------|---------------------------|------------------|
| | IC ₅₀ [μM] (n) | 2 nM MBN [%] (n) |
| α1 wt | 1,82 ± 0,81 (6) | 121 ± 5 (8) |
| α1F63A [#] | ≥ 1000* (6) | 141 ± 42 (16) |
| α1R65A | 0,92 ± 0,18 (5) | 121 ± 12 (8) |
| α1R131A | 30 ± 8* (5) | 123 ± 10 (12) |
| α1K200A | ≥ 1000* (5) | 191 ± 182 (4) |

Aufgelistet sind Mittelwerte ± (SD). Werte, die im Vergleich zum Wildtyprezeptor (wt) signifikant unterschiedlich sind ($p < 0,001$; Student's T-Test), sind durch einen Stern (*) markiert. Während die Inhibierung an der EC₅₀-Konzentration des vollen Agonisten Glycin aufgenommen wurde, wurde für die Potenzierung eine geringe, dem EC₁₀-Wert entsprechende Taurinkonzentration benutzt. n: Anzahl der Messungen. [#]Die Substitution α1F63 wurde in der Inhibierung von Gabor Maksay vermessen.

4.1.4.2 Potenzierende Wirkung des MBN am homooligomeren α1-GlyR

Neben der inhibierenden Wirkung von MBN ist bei geringen Agonistenkonzentrationen eine Potenzierung der Stromantwort zu beobachten. Für die Aufnahme der Potenzierung wurden die Oozyen mit der 2 nM MBN-Lösungen 1 Minute im Bad vorinkubiert. Anschließend wurde der Agonist für 8 Sekunden appliziert und die Stromantwort mit der vorherigen Stromantwort verglichen. Die Potenzierung wurde für den α1-Wildtyp sowie für die gleichen Mutationen bestimmt, die auch für die Inhibierung vermessen wurden. Dabei wurde die jeweilige Taurinkonzentration gewählt, die dem EC₁₀-Wert von Taurin entspricht, d.h. für den α1-Wildtyprezeptor wurden 300 μM, für die Substitution α1R65A 500 μM, für α1R131A 50 μM, und für α1F63A und α1K200A 10 mM, Taurin verwendet.

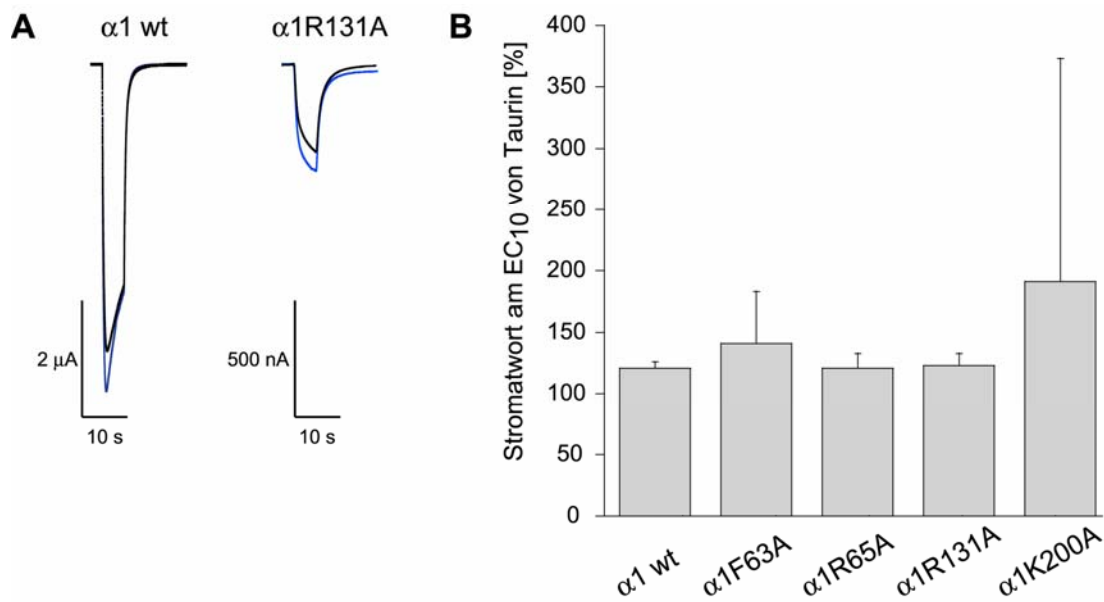


Abb. 4.8 Potenzierende Wirkung des Modulators MBN. **A.** Stromantworten hervorgerufen durch die EC₁₀-Konzentration von Taurin ohne (Stromantworten in schwarz) und in Gegenwart von 2 nM MBN (Stromantworten in blau). **B.** Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Potenzierung durch den Modulator MBN (2nM) am $\alpha 1$ -Wildtyp und den Mutanten $\alpha 1F63A$, $\alpha 1R65A$, $\alpha 1R131A$ sowie $\alpha 1K200A$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

$\alpha 1$ -Wildtyprezeptoren zeigen bei einer Konzentration von 2 nM MBN eine Potenzierung von $121 \pm 5\%$ (Abb. 4.8, Tab. 4.3). Alle anderen untersuchten Mutationen zeigen eine nicht signifikant veränderte Potenzierung gegenüber dem Wildtyprezeptor, die zwischen 121 und 141% liegen. Die Substitution $\alpha 1K200A$ zeigt als einzige eine Potenzierung von 191%. In diesem Fall sind aber nur wenige, stark voneinander abweichende Messpunkte vorhanden, die nach Bildung eines Mittelwertes in einer hohen Standardabweichung resultieren und somit keine signifikante Änderung gegenüber dem Wildtyprezeptor ergeben. Diese Resultate sprechen dafür, dass die potenzierende Wirkung von MBN unabhängig von Mutationen in der $\alpha 1$ -Ligandenbindungstasche ist, d.h. über die Bindung in einer anderen Tasche vermittelt wird.

4.1.5 Ligandenbindungsmodelle des $\alpha 1$ -GlyR

Die nachfolgend beschriebenen Modelle wurden in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Rudolf Schemm generiert.

4.1.5.1 Modell der Agonistenbindung am $\alpha 1$ -GlyR

Zur Generierung des neuen $\alpha 1$ -Agonistenbindungsmodells wurde angenommen, dass alle Reste, die nach Mutation in einer starken Abnahme der apparenten Affinität resultieren, innerhalb der Bindungstasche lokalisiert sein müssen. In dem so überarbeiteten Modell werden folgende molekulare Wechselwirkungen von Agonist und Rezeptor vorgeschlagen. Auf der (-)Seite ist der Rest $\alpha 1R65$ direkt an der Agonistenbindung beteiligt, indem er mit seiner positiven Ladung die α -Carboxylgruppe des Glycins (Abb. 4.9A) sowie die Sylfonylgruppe des Taurins (Abb. 4.9B) stabilisiert. Die α -Aminogruppen der beiden Agonisten interagieren mit der negativen Ladung des $\alpha 1E157$ auf der (+)Seite. Zusätzlich wird die α -Aminogruppe beider Liganden durch Kation- π -Wechselwirkungen mit den Aromaten $\alpha 1F207$ und dem bereits früher identifizierten $\alpha 1F159$ (Schmieden et al., 1993) stabilisiert, die ebenfalls auf der (+)Seite lokalisiert sind. Das Modell schlägt außerdem eine Interaktion der α -Carboxylgruppe des Glycins sowie der Sylfonylgruppe des Taurins mit den Hydroxylgruppen des $\alpha 1Y202$ und des $\alpha 1T204$ vor, die bereits in früheren Untersuchungen als für die Ligandenbindung wichtig identifiziert wurden (Rajendra et al., 1995b, Vandenberg et al., 1992b). Im Gegensatz dazu ist $\alpha 1F63$ auf der (-)Seite nicht direkt an der Agonistenbindung beteiligt. Vielmehr interagiert dieser Aromat mit den benachbarten Resten $\alpha 1R65$ und $\alpha 1R131$ und sorgt durch eine Kation- π -Wechselwirkung für die richtige Orientierung der Arginine. Auch die Seitenkette von $\alpha 1K200$ ist nicht direkt an der Agonistenbindung beteiligt, sondern bildet eine Salzbrücke mit dem Nachbarrest $\alpha 1E157D$.

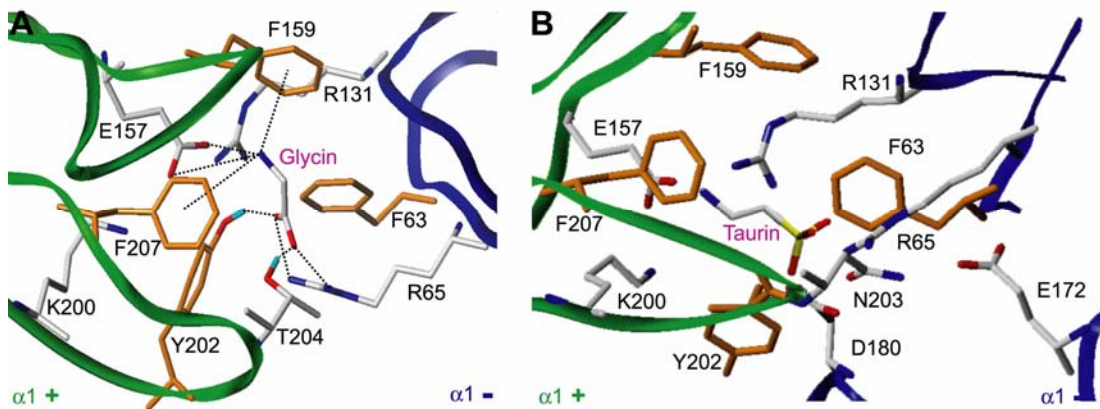


Abb. 4.9 Modell der Agonistenbindung am $\alpha 1$ -GlyR. Nahaufnahme der Ligandenbindungstasche mit den gebundenen Agonisten Glycin (A) und Taurin (B). Die Hauptketten der benachbarten Untereinheiten sind in grün und blau illustriert. Kohlenstoffe sind in weiß, Stickstoffe in blau, Sauerstoffe in rot und Wasserstoffe in türkis dargestellt. Alle Aromaten sind in orange angefärbt, um ihre ringförmige Anordnung um die Bindungstasche zu verdeutlichen. In A. sind zusätzlich die Hauptwechselwirkungen von Ligand und Seitenketten der Bindungstasche durch gestrichelte Linien hervorgehoben. In B. sind zusätzlich alle Reste, die untersucht wurden, gezeigt.

4.1.5.2 Modell der Antagonistenbindung am $\alpha 1$ -GlyR

Auch für den Antagonisten Strychnin wurde ein Ligandenbindungsmodell generiert. Strychnin ist am Stickstoff in Position 19 bei physiologischen pH-Werten protoniert (Becker, 1992) und trägt deshalb an dieser Stelle eine positive Ladung. Wie auch die α -Aminogruppe des Glycins, wird Strychnin durch die ionische Interaktion mit $\alpha 1$ E157 sowie durch die Kation- π -Wechselwirkung mit $\alpha 1$ F207 der (+)Seite der Kontaktstelle stabilisiert (Abb. 4.10A). Zusätzlich erfolgt eine π - π -Wechselwirkung von $\alpha 1$ Y202 mit dem aromatischen Ring von Strychnin. Trotz des Affinitätsverlustes nach Mutation von $\alpha 1$ T208 kann im Modell keine Interaktion dieses Restes mit Strychnin identifiziert werden (nicht gezeigt). Vielmehr ist dieser Effekt auf eine veränderte Orientierung des Nachbarrestes $\alpha 1$ F207 zurückzuführen. Der Sauerstoff an Position 24 von Strychnin bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem Rest $\alpha 1$ R131 der (-)Seite, dessen Ausrichtung durch die Kation- π -Wechselwirkung mit dem benachbarten $\alpha 1$ F63 stabilisiert wird. Die Interaktionen von $\alpha 1$ K200 mit $\alpha 1$ E157 bzw. von $\alpha 1$ R131 mit $\alpha 1$ F63 bleiben auch im strychningebundenen Modell erhalten.

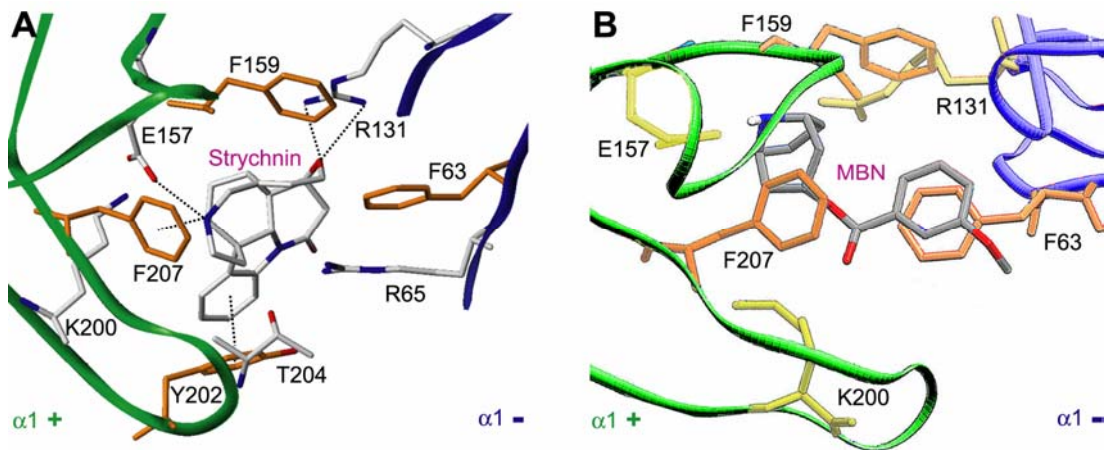


Abb. 4.10 Modell der Antagonistenbindung am α 1-GlyR. Nahaufnahme der Ligandenbindungstasche mit den gebundenen Antagonisten. Die Hauptketten beider benachbarten Untereinheiten sind in grün und blau dargestellt. Alle Aromaten sind in orange angefärbt, um ihre Ringförmige Anordnung um die Bindungstasche zu verdeutlichen. **A.** Bindung von Strychnin an den α 1-GlyR. Kohlenstoffe sind in weiß, Stickstoffe in blau und Sauerstoffe in rot dargestellt. Die Hauptwechselwirkungen von Strychnin und den Seitenketten der Bindungstasche sind durch gestrichelte Linien hervorgehoben. **B.** Bindung von MBN an den α 1-GlyR. Die Seitenketten der Bindungstasche sind in gelb dargestellt, während das MBN in grau gezeigt ist, wobei die Sauerstoffe in rot und die Stickstoffe des MBN in blau angefärbt sind. Diese Bild wurde mir freundlicherweise von G. Maksay zur Verfügung gestellt.

Das im Folgenden beschriebene α 1-Modell mit gebundenem MBN wurde in der Gruppe von G. Maksay (Hungarian Academy of Science, Budapest, Ungarn) generiert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. In der entsprechenden mit MBN ligandierten Modellstruktur bildet α 1F63 eine π - π -Wechselwirkung mit dem Aromaten des MBN (Abb.4.10B), während α 1K200 mit dem Carbonylsauerstoff des Esters eine Wasserstoffbrücke bildet. Die Reste α 1E157 und α 1R131 zeigen beide in Richtung des Stickstoffes und können über ionische bzw. Wasserstoffbrückenbindungen mit diesem interagieren.

4.2 Ligandenbindung am heterooligomeren $\alpha 1\beta$ -GlyR

4.2.1 Expression der GlyR β -Untereinheit in *Xenopus* Oozyten

Die Expression der β -Untereinheit des GlyRs resultiert in keinem messbaren Glycinstrom über der Membran (Bormann et al., 1993, Kuhse et al., 1993). Auch nach Applikation anderer Agonisten wie Taurin, β -Alanin oder GABA ist keine Stromantwort detektierbar. Jedoch war bis jetzt unklar, ob die β -Untereinheit überhaupt in der Lage ist, zu Multimeren zu assemblieren. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde die cRNA einer N-terminal 6xHis-getaggten β -Untereinheit in *Xenopus* Oozyten exprimiert, wie in Abschnitt 4.1.1.1 beschrieben metabolisch markiert und anschließend der BN-PAGE unterzogen.

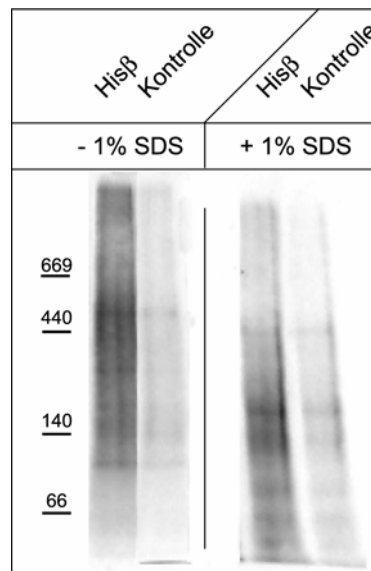


Abb. 4.11 Assemblierung der β -Untereinheit des GlyRs. Die β -Untereinheit wurde nach Injektion der cRNA in *Xenopus* Oozyten mit [35 S]Methionin metabolisch markiert, anschließend mittels Ni^{2+} -NTA Agarose über den N-terminal lokalisierten 6xHis-Tag aufgereinigt und entsprechend mit oder ohne Behandlung mit 1% SDS der BN-PAGE unterzogen. Als Kontrolle wurden nicht injizierte Oozyten verwendet. Das Molekulargewicht der Markerbanden ist in kD angegeben.

Wie in Abbildung 4.11 dargestellt, ist keine distinkte Bande auf dem Gel zu erkennen, was auf eine Aggregation und weniger auf eine definierte Assemblierung der β -Untereinheit zum Pentamer schließen lässt. Auch nach Behandlung mit 1% SDS lassen sich diese Aggregate nicht in Banden definierter Untereinheitenzusammensetzung dissoziieren. Dass aber die β -Untereinheit exprimiert wird, ist im folgenden Abschnitt gezeigt, da für die weiteren Experimente die gleiche Probe der aufgereinigten His β -Untereinheit verwendet wurde.

Um zu untersuchen, ob die nicht assemblierte β -Untereinheit komplex glykosyliert wird und eventuell als Monomer an die Oberfläche transportiert werden kann, wurde der Glykosylierungszustand mit Hilfe des in Abschnitt 4.1.1.2 beschriebenen EndoH- und PNGase F-Verdau untersucht.

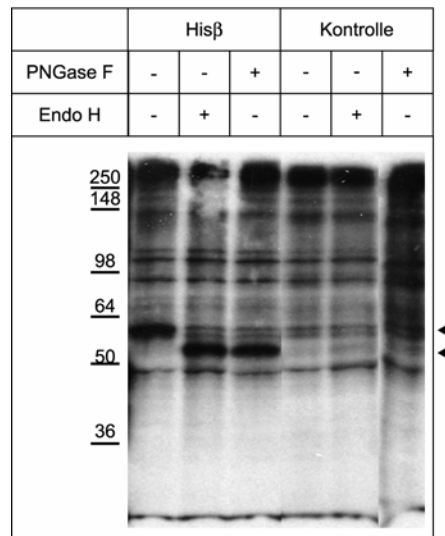


Abb. 4.12 Glykosylierung der β -Untereinheit des GlyRs. Die cRNA der β -Untereinheit wurde in *Xenopus* Oozyten injiziert, metabolisch markiert und anschließend mittels Ni^{2+} -NTA Agarose über den N-terminal lokalisierten 6xHis-Tag aufgereinigt. Nach entsprechender Behandlung mit EndoH oder PNGase F wurden die Proben der SDS-PAGE (9%) unterzogen. Als Kontrolle wurden nicht injizierte Oozyten verwendet. Die beiden Pfeilspitzen auf der rechten Seite deuten die glykosylierten sowie deglykosylierten Banden der β -Untereinheit an. Das Molekulargewicht der Markerbanden ist in kD angegeben.

Wie man der Abbildung 4.12 entnehmen kann, läuft die unbehandelte Probe der β -Untereinheit oberhalb der 50 kD und unterhalb der 64 kD-Bande des Markers, was in Übereinstimmung mit dem Molekulargewicht von 58 kD ist. Nach entsprechender Behandlung zeigt die β -Untereinheit eine starke Sensitivität sowohl gegenüber dem EndoH- als auch gegenüber dem PNGase F-Verdau, was auf eine nicht komplexe Glykosylierung und damit auf eine Lokalisation im ER schließen lässt.

4.2.2 Rettung der Glycinaffinität nach Koexpression der $\alpha 1$ -Mutanten mit der Wildtyp β -Untereinheit

Im adulten Rückenmark besteht der GlyR hauptsächlich aus α - und β -Untereinheiten. Die Rolle der α -Untereinheit in der Ligandenbindung wurde bereits intensiv untersucht, jedoch gibt es wenig Informationen über die Beteiligung der β -Untereinheit an der Bindung der Liganden. Um den Beitrag der β -Untereinheit zur Ligandenbindung im heterooligomeren $\alpha 1\beta$ GlyR zu untersuchen, wurden zunächst die $\alpha 1$ -Mutanten, die einen starken Einfluss auf die apparente Affinität des Glycins hatten, mit einer Wildtyp β -Untereinheit koexprimiert. Homo- ($\alpha 1$) und heterooligomere ($\alpha 1\beta$) GlyRs sind aufgrund ihrer apparenten Glycinaffinität kaum zu unterscheiden. Deshalb wurden die cRNAs der $\alpha 1$ und der β -Untereinheit in einem Verhältnis von 1:4 injiziert, um die Bildung von $\alpha 1$ -Homooligomeren zu minimieren.

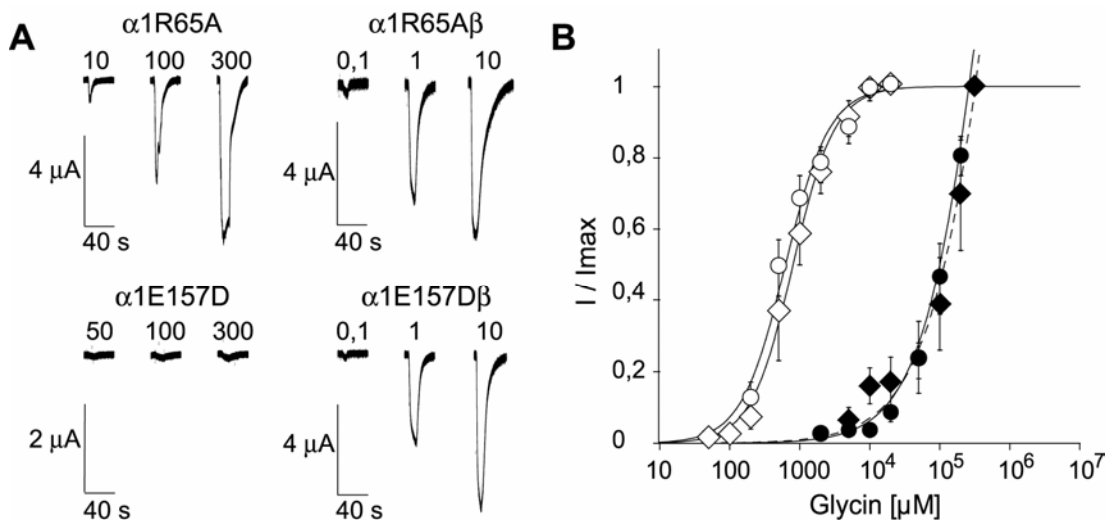


Abb. 4.13 Koexpression der $\alpha 1$ -Mutanten mit der Wildtyp β -Untereinheit. A. Stromantworten der homo- und heterooligomeren GlyRs. Nach Expression der $\alpha 1R65A$ und $\alpha 1E157D$ Mutanten wird die Sättigung der Stromantwort auch bei ≤ 300 mM Glycinkonzentrationen nicht erreicht und der Stromfluss der $\alpha 1E157D$ Substitution ist stark reduziert. Nach Koexpression beider Substitutionen mit der β -Untereinheit wird die Sättigung bereits bei niedrigen Glycinkonzentrationen von 10 mM erreicht. B. Dosiswirkungskurven der homooligomeren $\alpha 1R65A$ (●) und $\alpha 1E157D$ (◆), und heterooligomeren $\alpha 1R65A\beta$ (○) und $\alpha 1E157D\beta$ (◆) GlyRs. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SD.

Erstaunlicherweise war die β -Untereinheit in allen Fällen in der Lage, die reduzierte Affinität der $\alpha 1$ -Mutanten auf Wildtypniveau wiederherzustellen (Abb. 4.13, Tab. 4.4). Im Homooligomer zeigten die Substitutionen $\alpha 1R65A$ und $\alpha 1E157D$ stark erhöhte EC_{50} -Werte (≥ 250 mM), die nur abgeschätzt werden konnten, da auch mit ≤ 300 mM Glycin keine Sättigung der Stromantwort erreicht wurde. Im Gegensatz dazu, waren die heterooligomeren $\alpha 1R65A\beta$ - und $\alpha 1E157D\beta$ -Rezeptoren schon bei 5-10 mM Glycin gesättigt, was eine Rettung des apparenten Affinitätsverlustes durch die Koexpression mit der Wildtyp β -Untereinheit darstellt. Die Substitution $\alpha 1E157D$ äußerte sich im Gegensatz zu allen anderen Mutationen auch in einem signifikant reduzierten Stromfluss, der allerdings bei der Koexpression mit der β -Untereinheit wieder auf Wildtypniveau rückkehrte (Abb. 4.13). Beide heterooligomeren GlyRs haben einen EC_{50} -Wert ($\alpha 1R65A\beta$: $EC_{50} = 0,65 \pm 0,13$ mM; $\alpha 1E157D\beta$: $EC_{50} = 0,83 \pm 0,26$ mM), der gleich dem des Wildtyprezeptors ist ($\alpha 1\beta$ $EC_{50} = 0,48 \pm 0,15$ mM), d.h in beiden Fällen wurde eine Affinitätszunahme um den Faktor 300 erreicht. Diese Ergebnisse zeigen, dass die β -Untereinheit im Gegensatz zu früheren Annahmen einen wichtigen Beitrag zur Agonistenbindung leistet.

4.2.3 Partielle Rettung der Strychninaffinität

Als nächstes wurde untersucht, in wieweit die β -Untereinheit die reduzierte Strychninaffinität der Mutanten $\alpha 1R131A$ und $\alpha 1E157D$ wiederherstellen kann. Auch in diesem Versuch wurden die cRNAs der $\alpha 1$ - und der β -Untereinheiten in einem Verhältnis von 1:4 in Oozyten injiziert, um die Bildung von $\alpha 1$ -Homooligomeren zu minimieren.

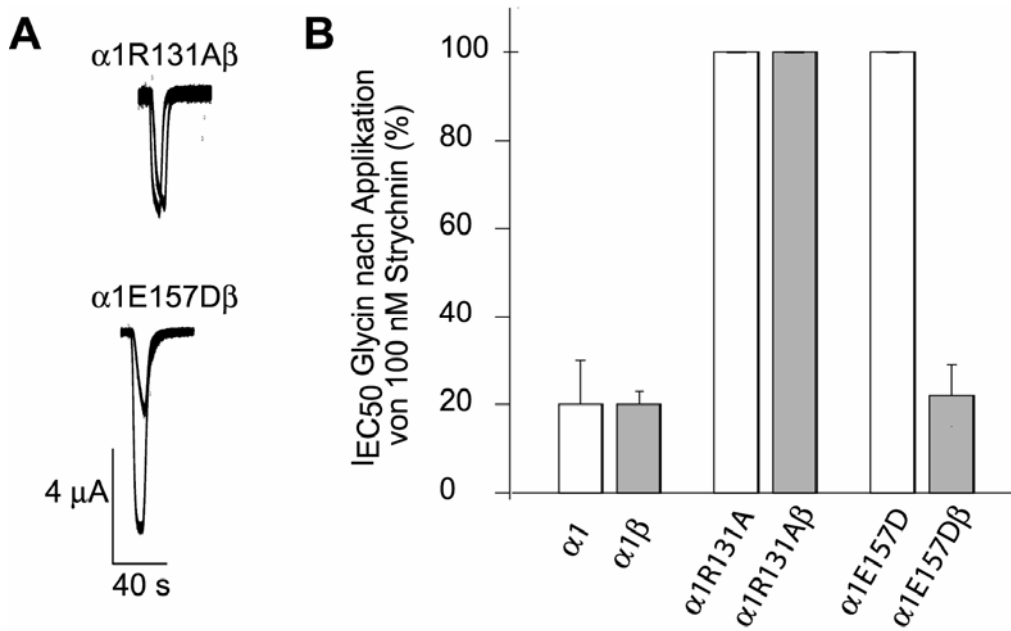


Abb. 4.14 Strychninbindung an homooligomeren $\alpha 1$ - und heterooligomeren $\alpha 1\beta$ -GlyRs. A. Stromantworten der Mutanten $\alpha 1R131A\beta$ und $\alpha 1E157D\beta$ vor und nach Applikation von 100 nM Strychnin am entsprechenden EC₅₀-Wert von Glycin. **B.** Balkendiagramm zum Vergleich der Hemmung von homo- (weiße Balken) und heterooligomeren (graue Balken) GlyRs nach Applikation einer 100 nM Strychninlösung in Gegenwart der entsprechenden EC₅₀-Glycinkonzentration. Im Gegensatz zum Wildtyp, der als Homo- und Heterooligomer gleichermaßen von einer 100 nM Strychninlösung gehemmt wird, zeigen homo- und heterooligomere GlyRs, die die $\alpha 1R131A$ Substitution enthalten, keine Hemmung bei 100 nM, während homooligomere $\alpha 1E157D$ nicht und heterooligomere $\alpha 1E157D\beta$ stark gehemmt werden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Im Gegensatz zur vollständigen Rettung der Glycinaffinität, ist die Strychninaffinität nur im Fall der $\alpha 1E157D\beta$ durch die Koexpression mit der β -Untereinheit gerettet, während sie bei $\alpha 1R131A\beta$ weiterhin stark verringert ist (Abb. 4.14). So hat die $\alpha 1E157D\beta$ einen IC_{50} -Wert von 35 ± 10 nM, während die $\alpha 1R131A\beta$ eine um das 550-fache reduzierte Strychninaffinität aufweist. Diese Ergebnisse zeigen, dass die β -Untereinheit in der Bindung des Antagonisten Strychnin eine andere Rolle einnimmt als bei der Bindung des Agonisten Glycin.

Tab. 4.4 Pharmakologie der $\alpha 1$ -Mutanten nach Koexpression mit der β -Untereinheit.

| injizierte cRNA | Glycin | | Strychnin |
|----------------------|-----------------------|-----------------|------------------------|
| | EC_{50} [mM] (n) | n_H | IC_{50} [nM] (n) |
| $\alpha 1\beta wt$ | $0,48 \pm 0,15$ (8) | $1,5 \pm 0,2$ | 32 ± 8 (5) |
| $\alpha 1R65A\beta$ | $0,65 \pm 0,13$ (6) | $1,5 \pm 0,2$ | NB |
| $\alpha 1R131A\beta$ | $0,57 \pm 0,2$ (5) | $1,0 \pm 0,3^*$ | $20000 \pm 4000^*$ (6) |
| $\alpha 1E157D\beta$ | $0,83 \pm 0,26^*$ (6) | $1,5 \pm 0,1$ | 35 ± 10 (5) |

Dargestellt sind Mittelwerte \pm (SD). Werte, die im Vergleich zum Wildtyp (wt) signifikant unterschiedlich sind ($p < 0,01$; Student's T-Test) sind durch einen Stern (*) markiert. n: Anzahl der Messungen; NB: nicht bestimmt.

4.2.4 Glycinbindung am $\alpha 1\beta$ -Heterooligomer

Alle an der Ligandenbindung der $\alpha 1$ -Untereinheit identifizierten Aminosäurereste sind auch innerhalb der β -Untereinheit konserviert. Deshalb wurden zur weiteren Verifizierung der Rolle der β -Untereinheit in der Ligandenbindung am heterooligomeren $\alpha 1\beta$ -GlyR Mutationen in die β -Untereinheit mittels PCR-Mutagenese eingeführt. Es wurden folgende Aminosäurereste zu Alanin ausgetauscht: $\beta R86A$, $\beta R154$, $\beta E180$, $\beta K223$, $\beta Y225$, $\beta K226$ und $\beta Y231$, die homolog zu den folgenden $\alpha 1$ -Resten sind (gleiche Reihenfolge): $\alpha 1R65$, $\alpha 1R131$, $\alpha 1E157$, $\alpha 1K200$, $\alpha 1Y202$, $\alpha 1N203$, $\alpha 1F207$. Zur Expression der Heterooligomeren wurden die cRNAs wieder in einem Verhältnis von $\alpha 1:\beta$ 1:4 injiziert. Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich homo- und heterooligomere GlyRs nicht in ihrem EC_{50} -Wert für Glycin. Allerdings zeigen beide Rezeptortypen eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Picrotoxinin (Pribilla et al., 1992). Während homooligomere α -GlyRs bei Applikation von 100 μM Picrotoxinin zu etwa 70-90% gehemmt werden, zeigen Heterooligomere keine Reduktion der durch Glycin verursachten

Stromantwort (Handford et al., 1996). Deshalb wurden alle Dosiswirkungskurven des Agonisten Glycin in Gegenwart von 100 μ M Picrotoxinin aufgenommen.

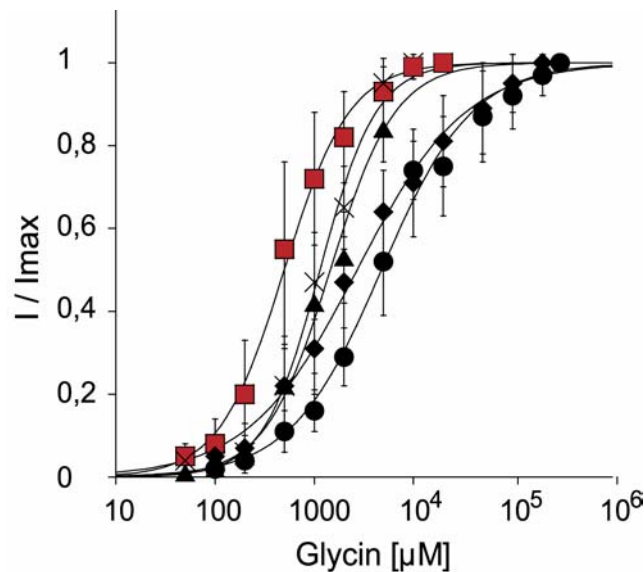


Abb. 4.15 Dosiswirkungskurven des Agonisten Glycin an heterooligomeren $\alpha 1\beta$ -GlyRs. Glycindosiswirkungskurven der heterooligomeren $\alpha 1\beta$ (■), $\alpha 1\beta R86A$ (●), $\alpha 1\beta E180A$ (◆), $\alpha 1\beta K223A$ (×) und $\alpha 1\beta Y225A$ (▲) GlyRs. Nach Expression der Rezeptoren in *Xenopus* Oozyten wurden Dosiswirkungskurven des Agonisten Glycin durch Applikation zunehmender Glycinkonzentrationen aufgenommen. Die Stromantworten wurden gegen den Maximalstrom I_{max} normiert und gegen die Glycinkonzentration aufgetragen. Datenpunkte entsprechen Mittelwerten \pm SD.

Erwartungsgemäß führten Substitutionen in der β -Untereinheit zu einer Reduktion der apparenten Affinität des Agonisten Glycin. So resultierte die Expression von $\alpha 1\beta R86A$ in einem heterooligomeren Rezeptor mit einem 10-fach erhöhten EC_{50} -Wert im Vergleich zum Wildtyprezeptor (Abb. 4.15, Tab. 4.5). Auch die Substitution $\alpha 1\beta E180A$ zeigte einen 4-fach höheren EC_{50} -Wert. Alle anderen Austausche ($\alpha 1\beta K223A$, $\alpha 1\beta Y225A$ und $\alpha 1\beta Y231A$) zeigten insgesamt einen geringeren Effekt, aber auch in diesen Fällen konnte eine ca. 2-3-fache Abnahme der apparenten Glycinaffinität beobachtet werden. Die Expression des Austausches $\alpha 1\beta K226A$ hingegen, war nicht signifikant unterschiedlich zum $\alpha 1\beta$ -Wildtyprezeptor. Wie bereits erwähnt ist dieser Rest homolog zum $\alpha 1N203$, der auch beim homooligomeren $\alpha 1$ -GlyR nach Substitution zum Alanin keinen signifikanten Einfluss auf die Agonistenaffinität hatte. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Substitution homologer Reste in der β -Untereinheit zum Affinitätsverlust

führt. Damit wird die Beteiligung der β -Untereinheit an der Ligandenbindung weiterhin bestätigt.

Tab. 4.5 Pharmakologie heterooligomerer GlyRs mit Mutationen in der β -Untereinheit.

| injizierte cRNA | Glycin | | Strychnin |
|-----------------------|---------------------------|----------------|---------------------------|
| | EC ₅₀ [mM] (n) | n _H | IC ₅₀ [nM] (n) |
| $\alpha 1\beta$ | 0,48 ± 0,15 (8) | 1,5 ± 0,2 | 32 ± 8 (5) |
| $\alpha 1\beta R86A$ | 5,7 ± 2,1* (6) | 1,0 ± 0,2* | NB |
| $\alpha 1\beta R154A$ | 0,93 ± 0,23* (8) | 1,5 ± 0,2 | 27 ± 9 (5) |
| $\alpha 1\beta E180A$ | 2,0 ± 0,8* (9) | 1,1 ± 0,3* | 210 ± 60* (5) |
| $\alpha 1\beta K223A$ | 1,2 ± 0,3* (7) | 1,6 ± 0,1 | 100 ± 14* (4) |
| $\alpha 1\beta Y225A$ | 1,6 ± 0,5* (5) | 1,5 ± 0,4 | 200 ± 30* (4) |
| $\alpha 1\beta K226A$ | 0,7 ± 0,2 (5) | 1,5 ± 0,2 | 23 ± 9 (4) |
| $\alpha 1\beta Y231A$ | 1,0 ± 0,2* (6) | 1,3 ± 0,2 | 28 ± 16 (4) |

Alle Werte sind Mittelwerte ± (SD). Bei signifikanten Unterschieden im Vergleich zum Wildtyp ($p < 0,01$; Student's T-Test) sind die Werte durch einen Stern (*) markiert. n: Anzahl der Messungen; NB: nicht bestimmt.

4.2.5 Strychninbindung am heterooligomeren $\alpha 1\beta$ -GlyR

Alle Mutationen der β -Untereinheit wurden auch auf ihren Einfluss auf die Strychninbindung untersucht. Die Substitution von $\beta R86$ wurde von diesem Versuch ausgeschlossen, da dieser Rest homolog zum $\alpha 1R65$ ist, der nach Mutation in keiner signifikanten Änderung der Strychninaffinität resultierte. Dazu wurden die cRNAs folgender Untereinheitenkombinationen in *Xenopus* Oozyten injiziert: $\alpha 1\beta$, $\alpha 1\beta R154A$, $\alpha 1\beta E180A$, $\alpha 1\beta K223A$, $\alpha 1\beta Y225A$, $\alpha 1\beta K226A$ und $\alpha 1\beta Y231A$. Die Aufnahme der Inhibierungskurven erfolgte durch Applikation zunehmender Strychninkonzentrationen in Gegenwart der entsprechenden EC₅₀-Glycinkonzentration.

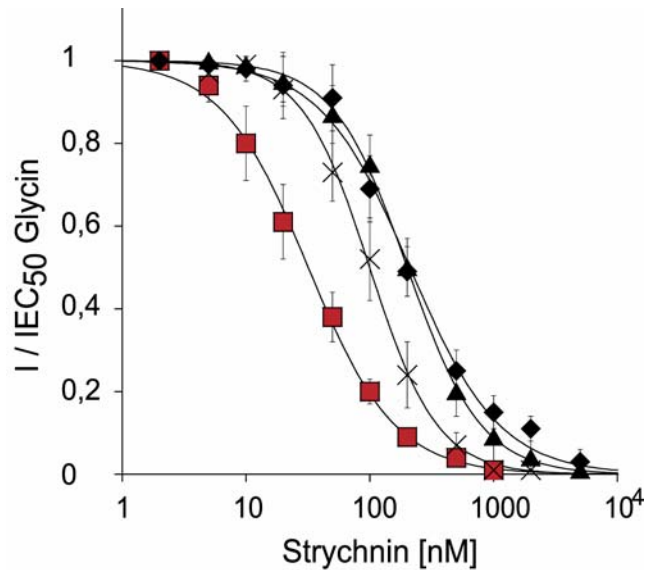


Abb. 4.16 Inhibierungskurven des Antagonisten Strychnin an heterooligomeren GlyRs. Dargestellt sind Strychnininhibierungskurven für den wt $\alpha 1\beta$ -GlyR (■) und folgende Mutanten $\alpha 1\beta$ E180A (◆), $\alpha 1\beta$ K223A (×) und $\alpha 1\beta$ Y225A (▲). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SD. Die Aufnahme erfolgte durch Applikationen zunehmender Strychninkonzentrationen in Gegenwart der entsprechenden EC_{50} -Glycinkonzentration. Die Stromantworten wurden auf die maximal erhaltene Stromantwort (IEC_{50} Glycin) normiert und gegen die Strychninkonzentration aufgetragen.

Interessanterweise zeigten nur die Austausche $\alpha 1\beta$ E180A, $\alpha 1\beta$ K223A und $\alpha 1\beta$ Y225A eine Auswirkung auf die Strychninaffinität. In den Fällen der Mutationen $\alpha 1\beta$ E180A und $\alpha 1\beta$ Y225A war der IC_{50} -Wert um das 10-fache erhöht (Tab. 4.5), während bei der Substitution $\alpha 1\beta$ K223A eine 5-fache Zunahme beobachtet werden konnte (Tab. 4.5). Diese Veränderung der Strychninaffinität ist auch in Abbildung 4.16 an einer Verschiebung der Inhibierungskurven der erwähnten Mutanten sichtbar. Bei den restlichen Austauschen $\alpha 1\beta$ R154A, $\alpha 1\beta$ K226A und $\alpha 1\beta$ Y231A konnte hingegen keine signifikante Veränderung der Strychninaffinität beobachtet werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Beteiligung der β -Untereinheit an der Ligandenbindung. Sie zeigen aber auch, dass es einen unterschiedlichen Beitrag der β -Untereinheit zur Strychninbindung gibt und zwar scheint es eine Rolle zu spielen, auf welcher Seite, (+) oder (-), sich die Substitution in der β -Untereinheit befindet.

4.2.6 Modell der Ligandenbindung am $\alpha 1\beta$ -Heterooligomer

Das folgende Modell wurde in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Rudolf Schemm erarbeitet. Dazu wurde die Struktur der extrazellulären Domäne der β -Untereinheit

des heterooligomeren GlyRs an die Kristallstruktur des AChBPs angepasst. Aufgrund der Asymmetrie jeder Untereinheit entstehen im Heterooligomer unterschiedliche Kontaktstellen, da die β -Untereinheit entweder auf der (+) oder auf der (-)Seite lokalisiert sein kann. Befindet sich die β -Untereinheit auf der (-)Seite, so trägt die Aminosäureseitenkette von β R86 zur ionischen Stabilisierung der α -Carboxylgruppe des Glycins bei, während alle anderen bereits beschriebenen Interaktionen der (+)Seite von der α 1 Untereinheit zur Verfügung gestellt werden (nicht gezeigt). Ist die β -Untereinheit auf der (+)Seite lokalisiert, so stabilisiert sie mit den Resten β E180, β F182 (homolog zu α 1F159) und β Y231 die α -Aminogruppe des Agonisten und trägt mit einer ionischen und zwei Kation- π -Wechselwirkungen zur Glycinbindung bei (Abb. 4.17A). Weiterhin wird die α -Carboxylgruppe des Glycins von den Hydroxylgruppen des β Y225 und β T228 durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert, während die ionische Interaktion von dem α 1R65 der (-)Seite gestellt wird.

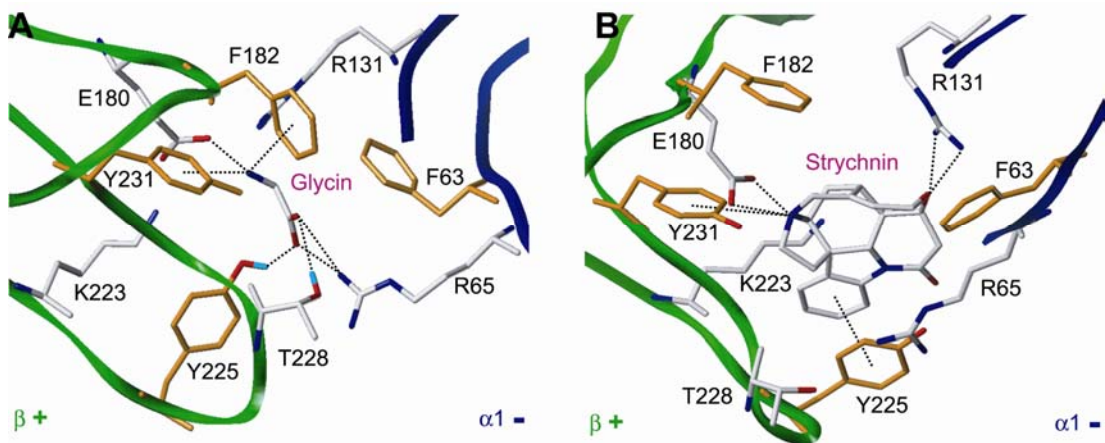


Abb. 4.17 Modell der Ligandenbindung am α 1 β -Heterooligomer. **A.** Nahaufnahme der Ligandenbindungstasche gebildet aus der β (+) α (-)-Kontaktstelle mit dem gebundenen Agonisten Glycin. **B.** Nahaufnahme der gleichen Ligandenbindungstasche wie in A. mit dem gebundenen Antagonisten Strychnin. **A.+B.** Die Hauptketten der benachbarten Untereinheiten sind in grün und blau dargestellt. Kohlenstoffe sind in weiß, Stickstoffe in blau, Sauerstoffe in rot und Wasserstoffe in türkis dargestellt. Alle Aromaten sind in orange angefärbt, um ihre ringförmige Anordnung um die Bindungstasche zu verdeutlichen. Die wichtigsten Interaktionen sind durch gestrichelte Linien angedeutet.

Im strychninligandierten Modell werden ähnlich wie bei Glycin alle Wechselwirkungen, die am Homooligomer von der α -Untereinheit zur Verfügung gestellt wurden, von der β -Untereinheit präsentiert. Befindet sich die β -Untereinheit auf der (+)Seite, so können β E180 und β Y231 mit der positiven Ladung des

Stickstoffs an Position 19 interagieren, während β Y225 eine π - π -Wechselwirkung mit dem Aromaten des Strychnins eingeht (Abb. 4.17B). Ist die β -Untereinheit hingegen auf der (-)Seite lokalisiert, so stabilisiert das β R154 den Sauerstoff an Position 24 des Strychnins. Die vom Modell vorgeschlagene Beteiligung von β Y231 stimmt nicht mit den Mutagenesedaten überein, jedoch hat die β -Untereinheit, im Gegensatz zur α 1-Untereinheit, eine zusätzliche Aminosäure in der Cysteinschleife. Somit kann die Faltung dieser Schleife nicht exakt der der α 1-Untereinheit entsprechen. Auch an Position 230 befindet sich ein Tyrosin, welches für die Stabilisierung des Strychnins sorgen könnte.

4.3 Stöchiometrie des heterooligomeren GlyRs

Vergleicht man die EC_{50} -Werte von homologen Substitutionen in der α 1- und in der β -Untereinheit, so kann man feststellen, dass sie eine unterschiedlich starke Auswirkung auf die apparente Affinität des Agonisten Glycin haben. Beispielsweise resultiert die Mutation der β -Untereinheit (α 1 β R86A: $EC_{50} = 5,7 \pm 2,1$ mM) in einem 10-fach höheren EC_{50} -Wert bzw. einer 10-fach niedrigeren apparenten Affinität für Glycin als die homologe Substitution in der α 1-Untereinheit (α 1R65A β ; $EC_{50} = 0,65 \pm 0,13$ mM). Geht man von der ursprünglich postulierten Untereinheitenstöchiometrie von 3 α 1:2 β (Langosch et al., 1988) aus, so werden demnach durch das Einführen einer Mutation in der α 1-Untereinheit drei Bindungsstellen zerstört, während zwei funktionelle Bindungsstellen für den Agonisten zur Verfügung stehen. Im umgekehrten Fall der homologen Substitution der β -Untereinheit wären nach der alten Stöchiometrie (3 α 1:2 β) nur zwei Bindungsstellen zerstört, wobei immer noch drei funktionelle Bindungstaschen vorhanden wären (vgl. Abb. 4.18). Die gemessenen Affinitätsreduktionen für die homologen Substitutionen scheinen also nicht mit der bisherigen Untereinheitenstöchiometrie des GlyRs übereinzustimmen. Nimmt man aber eine umgekehrte Stöchiometrie von 2 α 1:3 β -Untereinheiten an, so stimmt diese wesentlich besser mit den erhaltenen Reduktionen in der apparenten Glycinaffinität überein (Abb. 4.18). Nach Mutation der α 1-Untereinheit werden nun nur zwei Bindungsstellen verändert und es bleiben drei funktionelle erhalten, während nach Substitution der β -Untereinheit drei Bindungsstellen zerstört und lediglich noch zwei voll funktionsfähige verbleiben. Diese Ergebnisse implizieren, dass die bisher angenommene Untereinheitenstöchiometrie von 3 α 1:2 β -Untereinheiten des GlyRs

möglicherweise nicht stimmt. Deshalb sollte im Folgenden die Stöchiometrie des heterooligomeren $\alpha 1\beta$ -GlyRs näher untersucht werden.

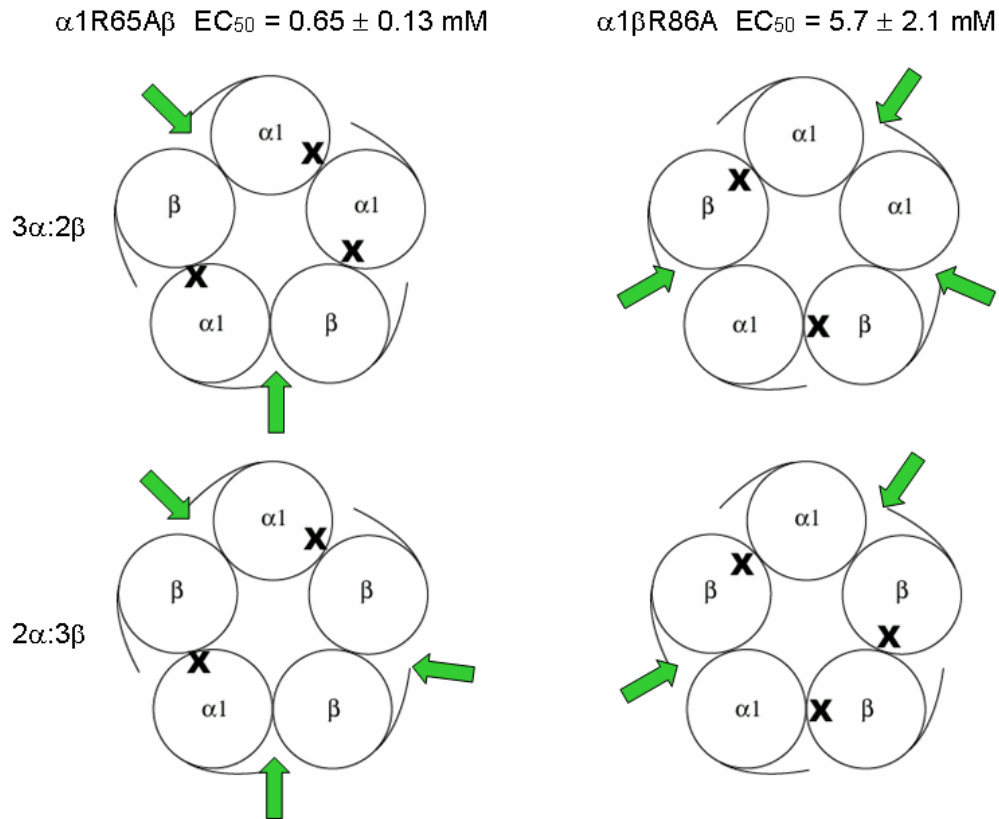


Abb. 4.18 Vergleich von homologen Substitutionen in der $\alpha 1$ - und der β -Untereinheit. Nach der bisher geltenden Stöchiometrie ($3\alpha 1:2\beta$) führt die Substitution $\alpha 1R65A$ zur Zerstörung von drei Bindungsstellen, wobei zwei funktionelle erhalten bleiben (grüne Pfeile), während die homologe Mutation in der β -Untereinheit ($\beta R86A$) lediglich zwei Bindungstaschen zerstört. Jedoch zeigt die β -Substitution einen 10-fach geringeren EC_{50} -Wert als die homologe $\alpha 1$ -Mutation. Bei der umgekehrten Stöchiometrie von $2\alpha 1:3\beta$ -Untereinheiten werden im Fall der $\alpha 1$ -Mutation nur zwei und beim β -Austausch drei Bindungstaschen zerstört.

4.3.1 Klonierung einer Tandemuntereinheit

Zur näheren Untersuchung der Stöchiometrie des GlyRs wurde die Strategie der konkatemeren Untereinheiten gewählt, d.h. zwei oder mehrere Untereinheiten werden mittels eines Linkers zu einer Tandemuntereinheit verbunden. In dieser Arbeit wurde eine $(\alpha\beta)_T$ -Tandemuntereinheit generiert, indem der C-Terminus der $\alpha 1$ -Untereinheit und den N-Terminus der β -Untereinheit mittels eines aus einer 7-fachen Wiederholung der Aminosäuren Alanin-Glycin-Serin (kodiert durch die Nukleotidsequenz GCTGGAAGT) bestehenden Linkers verbunden wurden (Zhou et

al., 2003). Zur Generierung einer Tandemuntereinheit im pNKS2#-Vektor wurde die in Abbildung 4.19 dargestellte Klonierungsstrategie gewählt:

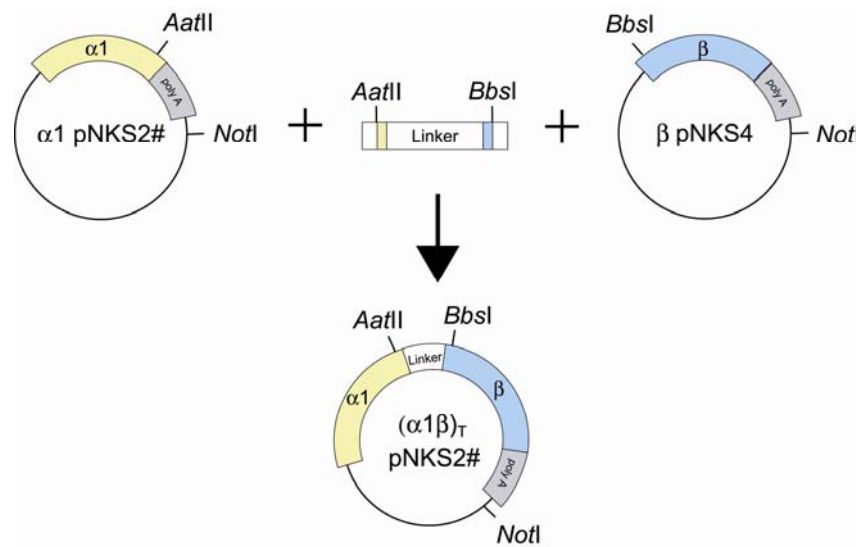


Abb. 4.19 Klonierung der Tandemuntereinheit $(\alpha 1\beta)_T$. Zur Generierung der Tandemuntereinheit wurde der C-Terminus der $\alpha 1$ -Untereinheit (gelb) mittels eines 21 Aminosäuren langen Linkers bestehend aus Alanin-Glycin-Serin (7-fache Wiederholung, dargestellt in weiß) mit dem N-Terminus der β -Untereinheit (blau) verbunden. Die Sequenzen der $\alpha 1$ - und der β -Untereinheit, die durch den Restriktionsverdau entfernt wurden, wurden innerhalb der Linkersequenz wiederhergestellt.

Zunächst wurde die $\alpha 1$ -Untereinheit im pNKS2#-Vektor mit den Restriktionsenzymen *AatII* und *NotI* verdaut, was zum Verlust der letzten vier C-terminalen Aminosäuren führte. Der Verdau der β -Untereinheit aus dem pNKS4-Vektor mit den Restriktionsenzymen *BbsI* und *NotI* resultierte im Verlust des Signalpeptides sowie der ersten N-terminalen Aminosäure. Diese verlorenen Sequenzen wurden innerhalb der Linkersequenz, die durch Anlagerung zweier Oligonukleotide (MWG Biotech AG, Ebersberg) generiert wurde, wiederhergestellt (Abb 4.19). Der so hergestellte Linker sowie die restringierte cDNA der β -Untereinheit wurden dann in den pNKS2#-Vektor, der die entsprechend verdaute $\alpha 1$ -Untereinheit enthielt, ligiert. Die Verifizierung der Klonierung erfolgte mittels Sequenzierung.

4.3.2 Expression einer Tandemuntereinheit

Zur Expression der Tandemuntereinheit $(\alpha\beta)_T$ wurde die *in vitro* synthetisierte cRNA zunächst alleine in *Xenopus* Oozyten injiziert. Es konnte gezeigt werden, dass

diese Untereinheit nicht in der Lage ist, einen funktionellen Rezeptor zu generieren (Abb. 4.20).

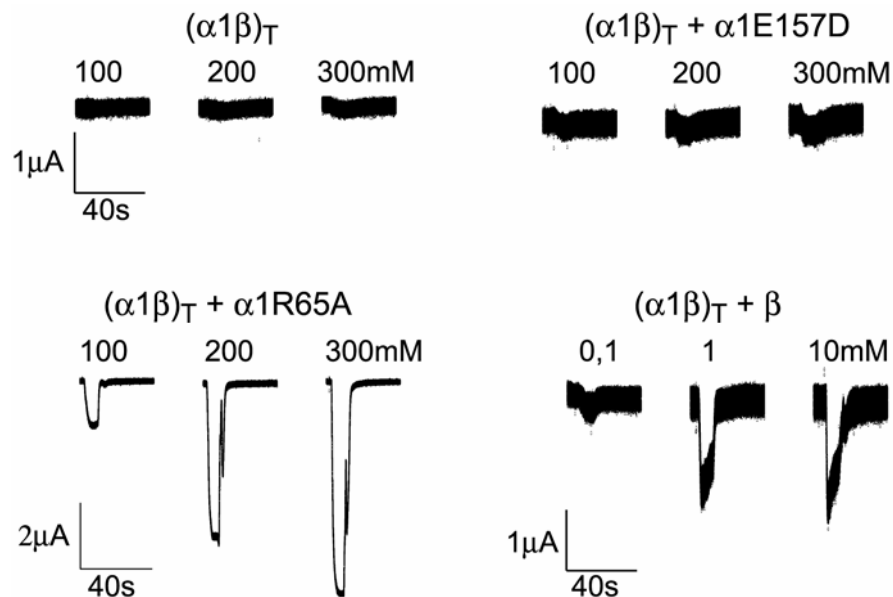


Abb. 4.20 Expression der $(\alpha 1\beta)_T$ -Tandemuntereinheit. Expression der Tandemuntereinheit in *Xenopus* Oozyten generierte keinen funktionellen Rezeptor, da auch bei 300 mM Glycin keine Stromantwort gemessen werden konnte. Die Koexpression der Tandemuntereinheit mit der $\alpha 1R65A$ sowie $\alpha 1E157D$ resultierte in GlyRs, die eine stark verringerte Affinität und im Fall der $\alpha 1E157D$ Substitution zusätzlich einen reduzierten Stromfluss aufzeigten. Nur die Koexpression der Tandemuntereinheit mit der β -Untereinheit bildete einen Rezeptor, der schon bei 5-10 mM Glycin wie Wildtyp $\alpha 1\beta$ -GlyRs eine Sättigung der Stromantwort zeigte.

Um festzustellen, ob die Tandemuntereinheit mit der $\alpha 1$ -Untereinheit assemblieren kann, wurden die $\alpha 1$ -Mutanten $\alpha 1R65A$ und $\alpha 1E157D$, die als Homopentamere eine stark reduzierte Glycinaffinität aufweisen, mit der Tandemuntereinheit $(\alpha\beta)_T$ koexprimiert. Eine $\alpha 1$ -Wildtypuntereinheit konnte nicht verwendet werden, da diese in jedem Fall effizient Homopentamere bildet und diese pharmakologisch nur schwer von den Heteropentameren unterschieden werden können. In den beiden Fällen der Koexpression von der Tandemuntereinheit $(\alpha\beta)_T$ mit den $\alpha 1R65A$ und $\alpha 1E157D$ Substitutionen wurden zwar funktionelle GlyRs erhalten, jedoch wiesen diese Rezeptoren die gleichen pharmakologischen Eigenschaften, wie die jeweiligen Homopentamere auf. So resultierte die Koexpression der Tandemuntereinheit $(\alpha\beta)_T$ mit der $\alpha 1R65A$ Substitution in einem GlyR mit stark reduzierter Glycinaffinität ($EC_{50} \geq 250$ mM, Tab. 4.6). Auch die Koexpression der Tandemuntereinheit $(\alpha\beta)_T$ mit der $\alpha 1E157D$ Mutante zeigte eine

stark verringerte Glycinaffinität. Zusätzlich konnte wie bei den Homopentameren eine signifikante Abnahme des Stromflusses beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ergab die Koexpression des Tandemkonstrukts mit der Wildtyp β -Untereinheit einen GlyR mit pharmakologischen Eigenschaften wie die des heterooligomeren Wildtyprezeptors. Dieser aus Tandemuntereinheit $(\alpha\beta)_T$ und Wildtyp β -Untereinheit bestehende GlyR hatte einen EC_{50} -Wert von $0,56 \pm 0,22$ mM (Tab. 4.6). Dieser Rezeptor zeigt zwar einen signifikant reduzierten Stromfluss gegenüber dem $\alpha1\beta$ -Wildtyprezeptor, jedoch kann das auf eine stark reduzierte Expression der Tandemuntereinheit $(\alpha\beta)_T$ zurückgeführt werden. Diese Ergebnisse sind also nur mit einer neuen Stöchiometrie von $2\alpha:3\beta$ vereinbar.

Tab. 4.6 Expression einer $(\alpha1\beta)_T$ -Tandemuntereinheit.

| injizierte cRNA | Glycin | |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------|
| | EC_{50} [mM] (n) | n_H |
| $\alpha1\beta$ | $0,48 \pm 0,15$ (8) | $1,5 \pm 0,2$ |
| $(\alpha1\beta)_T$ | NF (20) | - |
| $(\alpha1\beta)_T + \alpha1E157D$ | $\geq 250^*$ (6) | NB |
| $(\alpha1\beta)_T + \alpha1R65A$ | $\geq 250^*$ (6) | $2,7 \pm 0,5^*$ |
| $(\alpha1\beta)_T + \beta$ | $0,56 \pm 0,22$ (13) | $1,6 \pm 0,4$ |

Alle angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm (SD). Bei signifikanten Unterschieden im Vergleich zum Wildtyp ($p < 0,01$; Student's T-Test) sind die Werte durch einen Stern (*) markiert. n: Anzahl der Messungen; NF: nicht funktionell; NB: nicht bestimmt.

Um die Expression der Tandemuntereinheit biochemisch zu untersuchen, wurde das Tandemkonstrukt entweder alleine oder zusammen mit der β -Untereinheit für 48 h exprimiert. Aus 10-15 Oozyten wurde mechanisch ein Homogenat hergestellt, auf ein 9% SDS-Gel geladen und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Banden wurden unter Verwendung des mAb4a Antikörpers immunologisch detektiert.

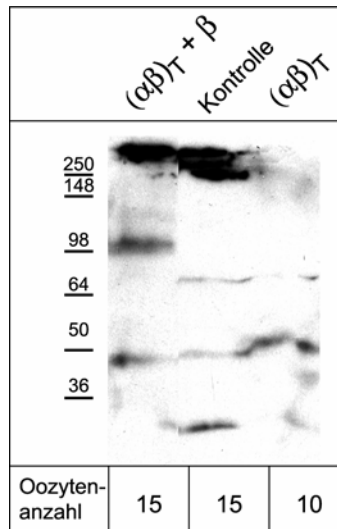


Abb. 4.21 Biochemische Untersuchung der Expression des Tandemkonstruktes $(\alpha\beta)_T$ in *Xenopus* Oozyten. Nach Expression der Tandemuntereinheit mit oder ohne β -Untereinheit wurden 10-15 Oozyten im entsprechenden Puffer aufgenommen und mechanisch durch Pipettieren aufgeschlossen. Das Lysat wurde einer SDS-PAGE mit anschließendem Westernblotting und Immundetektion unterzogen, wobei der mAb4a als Erstantikörper und ein Anti-Maus HRP-gekoppelter Zweitantikörper verwendet wurden. Als Kontrolle wurden nicht injizierte Oozyten verwendet.

Wie auf dem Gel in Abbildung 4.21 zu sehen ist, ist die Tandemuntereinheit nur nach Koexpression mit der β -Untereinheit und nicht bei alleiniger Expression als Bande auf dem Westernblot zu erkennen. Das hierbei beobachtete Molekulargewicht von > 98 kD der Tandemuntereinheit $(\alpha\beta)_T$ stimmt gut mit dem kalkulierten Molekulargewicht von 107 kD überein. In dieser Spur wurde außerdem eine Bande bei 58 kD erwartet, die der β -Untereinheit entspricht. Diese ist leider nicht detektierbar, jedoch kann das auf die geringe Sensitivität des mAb4a Antikörpers gegenüber dem β Polypeptid (Schroder et al., 1991) zurückgeführt werden. Die alleinige Expression der Tandemuntereinheit $(\alpha\beta)_T$ zeigte leider nicht die erwartete Bande von 107 kD. In diesem Fall muss aber berücksichtigt werden, dass statt 15, nur 10 Oozyten für das Experiment verwendet werden konnten. Außerdem kann es sein, dass aufgrund der Assemblierungsdefizienz das Tandemkonstrukt $(\alpha\beta)_T$ im ER einem schnellen Abbau unterzogen wird und deshalb nur eine geringe Proteinmenge in den Oozyten vorhanden ist, die unter der Nachweisgrenze liegt. Da die zwei Banden, die auf der Höhe der Markerbanden von 64 und zwischen 36 und 50 kD laufen, bei der Kontrolle bestehend aus nicht injizierten Oozyten vorhanden sind, kann geschlossen werden, dass es sich dabei um unspezifische Banden handelt.

5. Diskussion

5.1 Ligandenbindung am GlyR

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war, Aminosäurereste in der $\alpha 1$ -Bindungstasche zu identifizieren, die an der Interaktion mit verschiedenen Liganden beteiligt sind. Durch Kombination von zielgerichteter Mutagenese mit molekularem Modelling konnten basierend auf der Kristallstruktur des AChBP Modelle der $\alpha 1$ -Bindungstasche besetzt mit unterschiedlichen Liganden erstellt werden. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnten die molekularen Wechselwirkungen der Agonisten Glycin und Taurin sowie der Antagonisten Strychnin und MBN mit der $\alpha 1$ -Untereinheit identifiziert werden. So interagieren die Agonisten mit folgenden Resten der (+)Seite: $\alpha 1E157$, $\alpha 1F159$, $\alpha 1Y202$, $\alpha 1T204$ und $\alpha 1F207$, während auf der (-)Seite nur eine Wechselwirkung mit $\alpha 1R65$ erfolgt. Die Antagonisten hingegen wechselwirken auf der (+)Seite mit $\alpha 1E157$, $\alpha 1Y202$, $\alpha 1F207$ und auf der (-)Seite mit $\alpha 1R131$. Auch $\alpha 1F63$ und $\alpha 1K200$ hatten nach Substitution einen großen Einfluss auf die Agonisten- und Antagonistenaffinität, jedoch wird für diese beiden Reste keine direkte Beteiligung an der Ligandenbindung vorgeschlagen. Vielmehr tragen sie durch Interaktionen mit Nachbarresten zur Stabilität der Bindungstasche bei. Damit ermöglichen die in dieser Arbeit generierten Modelle zum ersten Mal die Diskriminierung zwischen einer direkten oder indirekten Beteiligung einzelner Seitenketten an der Ligandenbindung. Diese Modelle sind auch in guter Übereinstimmung mit den in der Einleitung beschriebenen, früheren Mutageneseergebnissen. Beispielsweise konnten Reste wie $\alpha 1Y202$ und $\alpha 1T204$ innerhalb der zweiten Disulfidbrücke (zwischen $\alpha 1C198$ und $\alpha 1C209$) und $\alpha 1F159$ (Rajendra et al., 1995b, Schmieden et al., 1993) in ihrer direkten Beteiligung an der Agonistenbindung bestätigt werden, während für $\alpha 1Y161$ (Schmieden et al., 1993) keine direkte Wechselwirkung gefunden wurde. Auch für $\alpha 1A52$, $\alpha 1W94$ und $\alpha 1N102$ (Ryan et al., 1994, Vafa et al., 1999) wird keine direkte Interaktion mit dem Liganden vorgeschlagen. Beide letztgenannten Reste befinden sich aber an der Kontaktstelle zwischen den Untereinheiten und sind wahrscheinlich an der Stabilisierung des Dimers beteiligt (nicht gezeigt), während $\alpha 1A52$ in der ersten konservierten Cysteinschleife lokalisiert und wahrscheinlich an der Rezeptoraktivierung beteiligt ist (Ryan et al., 1994). Auch für $\alpha 1T112$ (Schmieden et

al., 1999) wird keine direkte Wechselwirkung mit dem Liganden postuliert. Interessanterweise interagiert dieser Rest mit der Hauptketten-Carbonylgruppe von $\alpha 1$ R131 und stabilisiert damit dessen Ausrichtung. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in dieser Arbeit generierten Modelle sehr gut mit den bisherigen Mutagenesedaten übereinstimmen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Beteiligung der β -Untereinheit an der Ligandenbindung der heterooligomeren GlyRs. In bisherigen Untersuchungen war gezeigt worden, dass nach heterologer Expression die β -Untereinheit, im Gegensatz zu den α -Untereinheiten, nicht in der Lage ist, einen funktionellen Rezeptor zu bilden (Bormann et al., 1993, Kuhse et al., 1993). Die hier vorgelegte elektrophysiologische Untersuchung der heterooligomeren $\alpha 1\beta$ -GlyRs zeigt, dass entgegen früherer Annahmen die β -Untereinheit einen direkten Beitrag zur Ligandenbindung leistet. Zum einen konnte diese Untereinheit die stark verringerte Glycinaffinität der $\alpha 1$ -Mutanten fast auf Wildtypniveau retten, zum anderen resultierte die Einführung von homologen Alaninmutationen in die β -Untereinheit in einer Abnahme der apparenten Glycinaffinität. Außerdem zeigte die Charakterisierung der Strychninbindung, dass sich β -Mutationen nur dann auf die Strychninaffinität auswirken, wenn die β -Untereinheit auf der (+)- und nicht auf der (-)Seite lokalisiert ist. Ein Vergleich zwischen der $\beta\alpha$ - und der $\alpha\beta$ -Kontaktstelle im Modell zeigt aber auf den ersten Blick keine offensichtlichen Unterschiede zwischen beiden Kontaktstellen für die Strychninbindung (nicht gezeigt). Allerdings wurden in den elektrophysiologischen Experimenten nur wenige Mutationen getestet, weshalb zur genaueren Untersuchung weitere Substitutionen vermessen werden sollten. Im Modell trägt die β -Untereinheit mit homologen Resten zur Ligandenbindung bei. Befindet sich die β -Untereinheit auf der (+)Seite, so stabilisieren β E180, β F182, β T228, β Y225 und β Y231 den Agonisten und β E180, β Y225 sowie β Y231 den Antagonisten. Ist die β -Untereinheit hingegen auf der (-)Seite lokalisiert, so trägt β R86 zur Agonisten- und β R154 zur Antagonistenbindung bei. Alle elektrophysiologisch bestimmten Ergebnisse sind bis auf die Substitution β Y231, welche nach Austausch zu Alanin die Strychninaffinität nicht veränderte, in guter Übereinstimmung mit dem Modell. Im Gegensatz zur $\alpha 1$ -Untereinheit hat die β -Untereinheit eine zusätzliche Aminosäure in der C-Schleife; somit mag die Faltung

dieser Schleife nicht exakt der der α 1-Untereinheit entsprechen. Außerdem befindet sich an Position 230 ein weiterer Tyrosinrest, der eventuell für die Stabilisierung des Strychnins sorgen könnte. Die einzige bisher publizierte Punktmutation in der Ligandenbindungstasche der β -Untereinheit, β G229D (Rees et al., 2002), könnte die Wechselwirkung zwischen dem benachbarten β T228 und dem Agonisten beeinflussen, womit die Glycinbindung an der $\beta\alpha$ -Kontaktstelle gestört wäre.

5.2 Ligandenbindung in der Superfamilie der nAChR

Neben der Kristallstruktur des AChBP, in der kein Ligand, sondern das HEPES-Puffermolekül in der Bindungstasche lokalisiert war, wurde kürzlich die Kristallstruktur des AChBP mit den Liganden Nikotin und Carbamylcholin gelöst (Celie et al., 2004). In der neuen Kristallstruktur konnte sowohl die Orientierung der Liganden als auch die Wechselwirkung mit dem Rezeptor präzise aufgelöst werden.

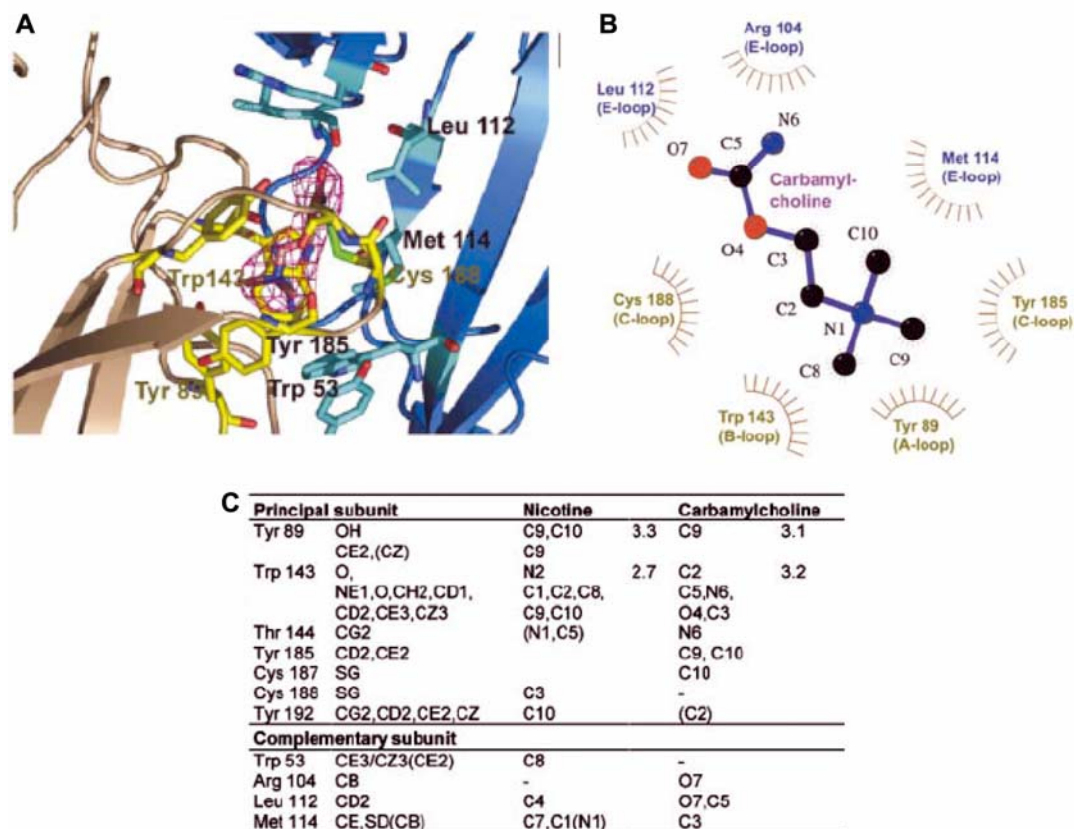


Abb. 5.1 Neue Kristallstruktur des AChBP. **A.** Nahaufnahme der Bindungstasche des AChBP mit gebundenem Carbamylcholin. Die Hauptketten der gegenüberliegenden Untereinheiten sind in grau ((+)Seite) und in blau ((-)Seite) dargestellt. **B.** Schematische Darstellung des Carbamylcholins in der Ligandenbindungstasche des AChBPs. **C.** Zusammenfassung aller Interaktionen der Liganden Nikotin und Carbamylcholin mit der Bindungstasche (verändert nach Celie et al. (2004) Neuron, 41, 907-914).

Da die Sequenzhomologie zwischen dem GlyR und dem AChBP nicht sehr groß ist und zusätzlich nur Carbamylcholin eine gewisse Strukturähnlichkeit zum Glycin hat, wird im Folgenden nur die Bindung von Carbamylcholin und nicht die von Nikotin an das AChBP mit der Bindung von Glycin an den GlyR verglichen. Beide Liganden zeigen zunächst die gleiche Ausrichtung in der Bindungstasche, d.h. die quarternäre Aminogruppe des Carbamylcholins und die α -Aminogruppe des Glycins interagieren mit der (+)Seite, während die Carbamylgruppe sowie die α -Carboxylgruppe beide mit der (-)Seite der Kontaktstelle wechselwirken. Ein Vergleich der Strukturen beider Liganden zeigt, dass sie nicht durch die gleichen Interaktionen in der Bindungstasche stabilisiert werden können. Denn im Gegensatz zum Glycin, das eine positive und negative Ladung an der α -Amino- bzw. α -Carboxylgruppe trägt, hat das Carbamylcholin insgesamt nur eine positive Ladung am quarternären Stickstoff. Diese positive Ladung kann aber aufgrund der hydrophoben Umgebung, die durch die drei Methylgruppen entsteht, nicht durch eine ionische Wechselwirkung stabilisiert werden. Deshalb erfolgt in diesem Fall eine Kation- π -Wechselwirkung mit drei Aromaten (Y89, W143 sowie Y185). Im Gegensatz dazu wird die α -Aminogruppe des Glycins durch eine ionische und durch Kation- π -Wechselwirkungen (mit α 1E157/ β E180, α 1F159/ β F182 und α 1F207/ β Y231) stabilisiert. Größere Unterschiede sind beim Vergleich der Interaktionen der α -Carboxylgruppe des Glycins und der Carbamylgruppe des Carbamylcholins zu finden. Die Carbamylgruppe, die keine Ladung trägt, wird durch zwei hydrophobe Wechselwirkungen und durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke (mit L112, M114 und R104) stabilisiert. Bei der negativ geladenen α -Carboxylgruppe des Glycins hingegen werden nur polare und ionische Interaktionen (mit α 1R65/ β R86, α 1Y202/ β Y225 und α 1T204/ β T228) gefunden. Vergleicht man die generelle Ausrichtung beider Gruppen, so gibt es jeweils eine Interaktion mit zwei nicht homologen Argininen. Das R104 des AChBP ist homolog zu GlyR α 1R119 bzw. β F142, d.h. dieser Rest ist der einzig untersuchte, der nicht zwischen α 1- und β -Untereinheit des GlyRs konserviert ist. Die Substitution des α 1R119 zeigte aber einen geringeren Effekt auf die apparente Affinität als die Mutation des α 1R65. Außerdem wäre an der $\beta\alpha$ -Kontaktstelle keine Stabilisierung der Carboxylgruppe vorhanden, da eine Interaktion des Aromaten mit der negativen Ladung eher unwahrscheinlich ist. Zusätzlich wären bei einer Orientierung der α -

Carboxylgruppe in Richtung des $\alpha 1R119$ keine Wechselwirkungen mit den Resten $\alpha 1Y202/\beta Y225$ und $\alpha 1T204/\beta T228$ möglich. Deshalb wurde angenommen, dass die α -Carboxylgruppe des Glycins zu den Argininen $\alpha R65/\beta R86$ orientiert ist. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Modell an dieser Stelle nicht richtig ist, da es auf der Kristallstruktur des AChBP basiert, die eine geringere Auflösung hat und die ohne den tatsächlichen Liganden gelöst wurde. Vergleicht man aber die Länge beider Agonisten, so ist das Carbamylcholin um insgesamt drei Atome länger als Glycin. Deshalb wäre eine unterschiedliche Orientierung beider Agonisten schon aufgrund ihrer Länge möglich.

Ein weiterer wichtiger inhibitorischer Chloridkanal ist der γ -Aminobuttersäurerezeptor (GABAR), der zu der Superfamilie der nAChR gehört. Je nach Untereinheitenzusammensetzung kann man zwischen GABA_A und GABA_C Rezeptoren unterscheiden. GABA_AR sind heterooligomere Komplexe, die am häufigsten aus je zwei $\alpha 1$ - und $\beta 2$ - sowie einer γ -Untereinheit bestehen (McKernan und Whiting, 1996, Macdonald und Olsen, 1994). GABA_CR hingegen sind Homooligomere und werden aus $\rho 1$ - und $\rho 2$ -Untereinheiten gebildet (Chebib, 2004). Zwar besteht zwischen den GABAR und dem GlyR nicht die höchste Homologie, jedoch werden diese Vertreter der nAChR-Superfamilie durch strukturähnliche Liganden, nämlich GABA und Glycin aktiviert, die sich lediglich in ihrer Länge unterscheiden, jedoch beide eine Carboxyl- und Aminogruppe mit entsprechenden Ladungen besitzen. Zahlreiche Mutagenesestudien wurden auch am GABA_AR durchgeführt und konnten zeigen, dass die Bindung des Agonisten GABA an der Kontaktstelle gebildet aus β - und α -Untereinheit erfolgt, wobei sich die β -Untereinheit auf der (+)- und die α -Untereinheit auf der (-)Seite befindet (Cromer et al., 2002). Damit werden für die Rezeptoraktivierung nur zwei GABA-Moleküle benötigt. Interessanterweise sind alle Reste, die für die Bindung von Glycin als essentiell identifiziert worden sind, auch in den GABA_AR-Untereinheiten konserviert, jedoch nur auf den entsprechenden Seiten der Kontaktstelle. So ist innerhalb der $\alpha 1$ -Untereinheit das Arginin und das Phenylalanin vorhanden, das homolog zu den GlyR $\alpha 1$ -Resten $\alpha 1F63$ und $\alpha 1R65$ ist. Das entsprechende Glutamat sowie die meisten Reste innerhalb der C-Schleife sind hingegen nicht konserviert. Eine entgegengesetzte Situation ist bei der $\beta 2$ -Untereinheit des GABAR zu finden. Dort sind das Glutamat (homolog zum $\alpha 1E157D$ des GlyR) und alle Reste

der C-Schleife (homolog zu $\alpha 1K200$, $\alpha 1Y202$, $\alpha 1T204$ und $\alpha 1F207$) konserviert, während die Reste der (-)Seite nicht vorhanden sind. Für die meisten dieser Aminosäurereste des GABA_AR konnte bereits durch Mutageneseexperimente in ihrer wichtigen Beteiligung an der Agonistenbindung bestätigt werden (Newell et al., 2004, Cromer et al., 2002). Innerhalb der ρ -Untereinheiten des GABA_CR sind dagegen alle Reste bis auf den zum $\alpha 1K200$ des GlyR homologen Rest konserviert. Diese stark ausgeprägte Homologie zeigt, dass die in dieser Arbeit identifizierten Reste nicht nur für die Agonistenbindung am GlyR, sondern für alle inhibitorischen Mitglieder der Superfamilie der nAChR von essentieller Bedeutung sind.

5.3 Aktivierungsmechanismus der nAChR

Das Wissen über den Aktivierungsmechanismus der Mitglieder der Superfamilie der nAChR beschränkt sich hauptsächlich auf die von Unwin und Kollegen durchgeführten elektronenmikroskopischen Analysen des muskulären, nikotinischen Acetylcholinrezeptors, der im elektrischen Organ des Aales *Torpedo Californica* in hoher Zahl und Dichte lokalisiert ist (Unwin, 2005 und 2003, Unwin et al., 2002). Auch durch die Untersuchung der ligandeninduzierten Konformationsänderungen mittels Tryptophanfluoreszenz am AChBP konnten Einblicke in den Aktivierungsmechanismus gewonnen werden (Gao et al., 2005). Diese Untersuchungen werden durch zahlreiche Mutageneseexperimente an allen Mitgliedern der Superfamilie ergänzt (Sixma und Smit, 2003, Arias, 2000). Im Fall des muskulären nAChR erfolgt die Bindung des Agonisten nur an den Kontaktstellen, die aus $\alpha(+)\gamma(-)$ und $\alpha(+)\delta(-)$ Untereinheiten gebildet werden, so dass auch hier nur zwei Agonistenmoleküle für die Aktivierung des Rezeptors notwendig sind (Corringer et al., 2000). Die Bindung des Agonisten Acetylcholin erfolgt mit den zum AChBP homologen Resten und resultiert zunächst in einer lokalen Konformationsänderung der Bindungstasche. Diese setzt sich dann in einer großen Drehbewegung der ganzen α -Untereinheit fort, die dann in der Kanalöffnung resultiert (Unwin, 2005, Miyazawa et al., 2003), d.h. Unwin und Kollegen postulieren, dass lediglich die α -Untereinheiten an der Rezeptoraktivierung beteiligt sind. Die Ligandenbindung erfolgt wie auch beim AChBP in der großen N-terminalen Domäne ungefähr 40 Å oberhalb der Transmembranhelices. Die N-terminale Domäne ist insgesamt über drei Schleifen, nämlich der in der Superfamilie konservierten Cysteinschleife, der $\beta 1\beta 2$ - und der $\beta 9\beta 10$ -Schleife mit den

Transmembranregionen verbunden. Dabei interagieren die Cystein- und die $\beta 1\beta 2$ -Schleife mit dem extrazellulären Abschnitt der Transmembranhelices M2 und M3 (Abb. 5.2A), wobei die Cysteinschleife am N-Terminus von M3 und die $\beta 1\beta 2$ -Schleife am C-Terminus der M2 bindet (Unwin, 2005, Miyazawa et al., 2003). Wie in Abbildung 5.2B dargestellt, ist der Abstand im unligandierten Zustand zwischen dem W143 und dem in der C-Schleife lokalisierten Y190 der α -Untereinheit recht groß (Miyazawa et al., 2003). Durch die Bindung des Liganden bewegen sich sowohl das W149 als auch die C-Schleife zum Liganden. Das W149 befindet sich in der Schleife zwischen den Faltblättern $\beta 7\beta 8$, wobei $\beta 8$ in Kontakt zu $\beta 1$ steht. Die Bewegung der C-Schleife und des W149 führt letztendlich zu einer Drehung der sich zwischen den Faltblättern $\beta 1\beta 2$ befindenden Schleife um 15° im Uhrzeigersinn (Abb. 5.2C), die dann in einer Drehung der Transmembranregion M2 resultiert und somit zur Kanalöffnung führt. Welche Beteiligung die (-)Seite der Kontaktstelle an der Rezeptoraktivierung hat, ist bislang unklar. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die von Unwin und Kollegen (2003) bestimmte Struktur einem desensitisierten Zustand entspricht.

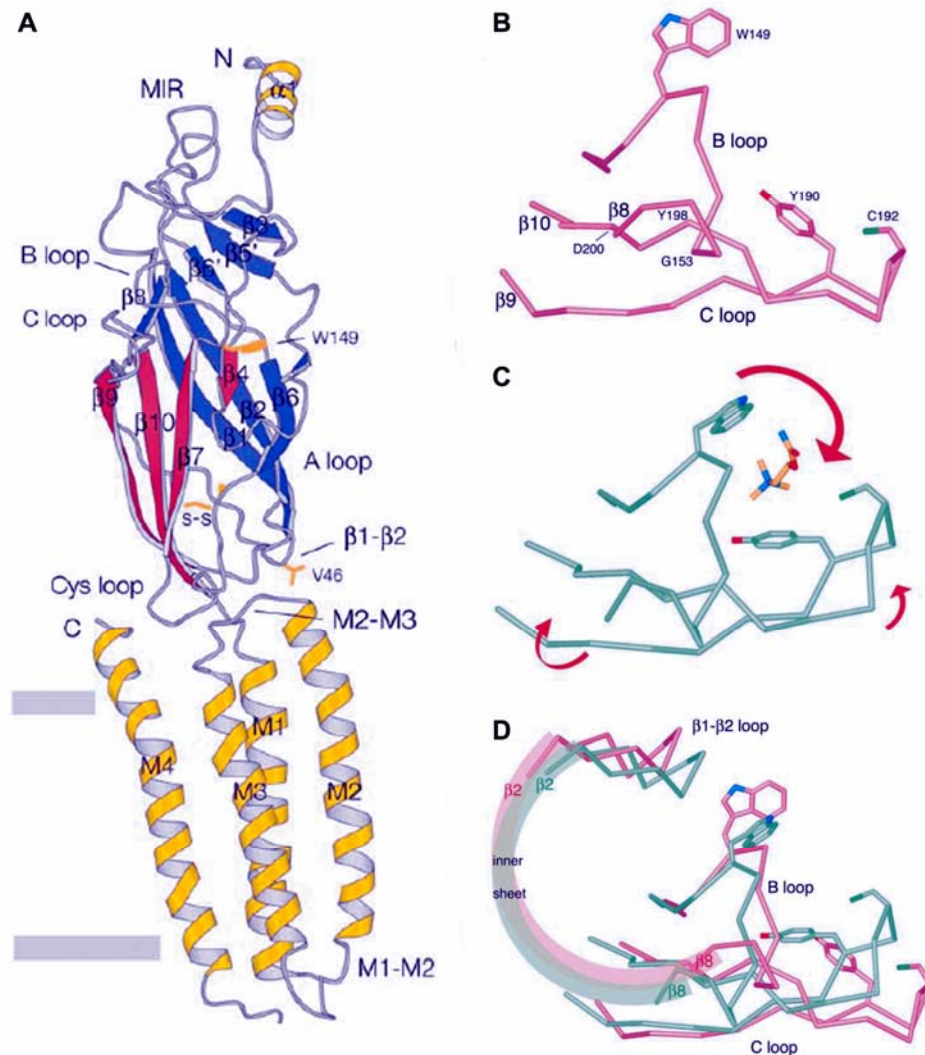


Abb. 5.2 Aktivierungsmechanismus am muskulären nAChR. **A.** Seitenansicht der elektronenmikroskopisch bestimmten Struktur der $\alpha 1$ -Untereinheit von *Torpedo Californica*. Die Helices sind in gelb, der innere β -Falblatttrichter in blau und der äußere in rot gezeigt. Die intrazellulär lokalisierte M3M4-Schleife ist nicht dargestellt. **B.** Ansicht der $\alpha 1$ -Bindungstasche von oben ohne gebundenen Agonisten. Dargestellt ist die (+)Seite der Kontaktstelle mit den wichtigsten, ligandenbindenden Resten. **C.** Gleiche Darstellung wie in B, jedoch nach Bindung des Agonisten Carbamylcholin. Die Bewegung aller Proteinabschnitte ist durch rote Pfeile angedeutet. **D.** Überlagerung der Strukturen dargestellt in B. und C. Die Verbindung durch den inneren β -Falblatttrichter zu der $\beta 1\beta 2$ -Schleife ist angedeutet (verändert nach Unwin, N., J. Mol. Biol. (2005) 346, 967-989).

Die Untersuchung der Tryptophanfluoreszenz am AChBP nach Ligandenbindung kombiniert mit molekularer Dynamik (MD) konnte ausserdem zeigen, dass der Abstand zwischen den Tryptophanen W143 auf der (+)Seite und W53 auf der (-)Seite unmittelbar nach Bindung des Liganden Acetylcholin verringert wird (vgl. Abb. 5.1A). Anschließend bewegt sich, wie auch von Unwin und Kollegen gefunden,

die C-Schleife in Richtung des Liganden (Gao et al., 2005). Somit liefert diese Arbeit die erste Evidenz, dass auch die (-)Seite der Kontaktstelle an der Rezeptoraktivierung beteiligt ist.

Die Mitglieder der nAChR-Superfamilie haben zwar den gleichen evolutionären Ursprung (Ortells und Lunt, 1995), die Homologie zwischen den Untereinheiten verschiedener Rezeptoren ist aber nicht sehr groß und liegt bei maximal ca. 30-40% (Betz, 1990). Da auch die wirkenden Liganden in ihrer Struktur nicht sehr ähnlich sind, stellt sich die Frage, ob diese unterschiedlichen Rezeptoren den gleichen Aktivierungsmechanismus haben. Interessanterweise konnten mehrer Ansätze, in denen Chimären aus verschiedenen N-terminalen Domänen und Transmembranregionen generiert wurden, zeigen, dass diese Rezeptoren funktionell sind. So konnte zum einen die extrazelluläre Domäne der GABA_AR $\rho 1$ -Untereinheit erfolgreich an die Transmembrandomänen der GlyR $\alpha 1$ -Untereinheit gekoppelt werden (Mihic et al., 1997), zum anderen war der Rezeptor bestehend aus der extrazellulären Domäne der nAChR $\alpha 7$ -Untereinheit, die an die Transmembranregion des 5HT₃-Rezeptors fusioniert wurde, funktionell (Bouzat et al., 2004, Eisele et al., 1993). Auch die Kopplung des AChBP an die Transmembrandomänen des 5HT₃-Rezeptors resultierte in einem durch Acetylcholin aktivierbaren Kanal (Bouzat et al., 2004). Diese Experimente sind ein starker Hinweis, dass in der Superfamilie der nAChR bei allen Mitgliedern ein ähnlicher Aktivierungsmechanismus vorhanden ist. Im Detail scheint es aber Unterschiede zu geben, denn beispielsweise wird in Unwins Studien ein Valinrest (nAChR $\alpha 1V46$), der in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife lokalisiert ist (Abb. 5.2A), als der Schlüsselrest vorgeschlagen, der mit hydrophoben Seitenketten der Transmembranhelix M2 interagiert (Unwin, 2005, Miyazawa et al., 2003). Interessanterweise ist weder dieses Valin noch der hydrophobe Abschnitt bei allen anderen Mitgliedern der Familie zu finden (Abb. 5.3).

| | $\beta 1\beta 2$ - Schleife | Cys-Schleife | M2M3-Schleife |
|--------------------------------|--------------------------------|------------------|---------------------|
| AChBP | EITN | CDVSGVDTESG-ATC | - |
| nAChR TC $\alpha 1$ | EVNQ | CEIIIVTHFPFDQQNC | ELIPSTSSAVPLIGKYML |
| nAChR h $\alpha 7$ | EKNQ | CYIDVRWFPPFDVQHC | EIMPATSDSVPLIAQYFA |
| GlyR h $\alpha 1$ | ETTM | CPMDLKNFPMQVQTC | ASLPKVSYS-VKAIDIWMA |
| GlyR h β | ETTM | CPLDLTLFPMDTQRC | AELPKVSYS-VKALDVWLI |
| GABA _A h $\alpha 1$ | DHDM | CPMHLEDFPMDAHAC | NSLPKVAY-ATAMDWFIA |
| GABA _A h $\beta 2$ | EVNM | CMMDLRRYPLDEQNC | ETLPKIPY-VKAIDMYLM |

Abb. 5.3 Partieller Sequenzvergleich der Mitglieder der nAChR-Superfamilie. Dargestellt sind die Sequenzen der $\beta 1\beta 2$ -, der Cystein- und der M2M3-Schleife (Regionen, die für die Rezeptoraktivierung essentiell sind) des AChBP, der $\alpha 1$ -Untereinheit des nAChR aus Torpedo Californica, sowie die humanen Untereinheiten von nAChR ($\alpha 7$), GlyR ($\alpha 1$ und β) und GABA_AR ($\alpha 1$ und $\beta 2$).

Außerdem wurde von Unwin und Kollegen postuliert, dass nur die $\alpha 1$ -Untereinheit des nAChR maßgeblich an der Kanalaktivierung beteiligt ist. Auf den GABA_AR übertragen würde das bedeuten, dass nur die $\beta 2$ -Untereinheit die Kanalöffnung bedingt, da der Agonist an der $\beta 2(+)\alpha 1(-)$ -Kontaktstelle gebunden wird (Cromer et al., 2002, Smith und Olsen, 1995). Es konnte aber gezeigt werden, dass neben der $\beta 2$ - auch die $\alpha 1$ -Untereinheit des GABA_AR einen Beitrag zur Kanalaktivierung leistet (Kash et al., 2004, Kash et al., 2003). Dieser Beitrag scheint nicht durch hydrophobe, sondern durch ionische Wechselwirkung zwischen der $\beta 1\beta 2$ - und der M2M3-Schleife vermittelt zu werden. Die $\alpha 1$ -Untereinheit des GABA_AR trägt in der Cystein- und in der $\beta 1\beta 2$ -Schleife mehrere negative Ladungen ($\alpha D57$, $\alpha D149$), die mit einer positiven Ladung in der M2M3-Schleife der Transmembranregionen ($\alpha K279$) interagieren. Es konnte gezeigt werden, dass nach Deletion dieser Ladung der Rezeptor nicht mehr aktiviert werden konnte, jedoch nach Ladungsumkehr in beiden Proteinabschnitten der Kanalöffnungsprozess wieder ermöglicht wurde (Kash et al., 2003). Gleiche Wechselwirkungen wurden auch innerhalb der β -Untereinheit des GABA_AR gefunden (Kash et al., 2004).

5.4 Möglicher Aktivierungsmechanismus am GlyR

Verglichen mit allen anderen Mitgliedern der Superfamilie scheint der heterooligomere GlyR eine Sonderstellung einzunehmen. Es handelt sich dabei um den einzigen Rezeptor, bei dem alle Reste, die an der Ligandenbindung beteiligt

sind, sowohl in der α - als auch in der β -Untereinheit konserviert sind. Die Analyse von Ligandenbindungsmodellen, die im vorhergehenden Abschnitt genau beschrieben wurden, ergab keine Präferenz des Agonisten für eine bestimmte Art von Kontaktstellen ($\beta\alpha$ oder $\alpha\beta$). Zudem haben Einzelkanalstudien gezeigt, dass für die Aktivierung des homo- und des heterooligomeren GlyRs mehr als zwei Glycinmoleküle benötigt werden (Burzomato et al., 2004, Colquhoun und Sivilotti, 2004, Beato et al., 2002, Laube et al., 2000). Damit erscheint es unwahrscheinlich, dass nur bestimmte Kontaktstellen für die Bindung des Agonisten genutzt werden. Auch die Tatsache, dass Mutationen den EC_{50} -Wert in heterooligomeren Rezeptoren mit unterschiedlichen Kontakstellen im Vergleich zum Homooligomer eher geringfügig (5-10fach) verändern, impliziert, dass sowohl $\alpha\beta$ - wie $\beta\alpha$ -Kontaktstellen zur Ligandenbindung genutzt werden können. Aufgrund meiner Daten erfolgt die Bindung des Agonisten primär über ionische Wechselwirkungen mit Arginin $\alpha1R65/\beta R86$ und Glutamat $\alpha1E157/\beta E180$. Interessanterweise nahm nach Substitution dieser beiden Reste der $\alpha1$ -Untereinheit die Aktivierungseffizienz des um ein C-Atom längeren Taurins zu. Nach dem Aktivierungsmodell von Unwin und Kollegen (2003) würden sich nach Bindung des Liganden die B- und die C-Schleife der (+)Seite der Kontaktstelle in Richtung der Bindungstasche bewegen (vgl. Abb. 5.2C). Dadruch würden weitere Interaktionen des Agonisten mit $\alpha1F159/\beta F182$ der B- und $\alpha1T204/\beta T228$, $\alpha1Y202/\beta Y225$ und $\alpha1F207/\beta Y231$ der C-Schleife ermöglicht werden, die so eventuell den aktivierten Zustand stabilisieren.

Die Untersuchung des Aktivierungsmechanismus am GlyR $\alpha1$ -Homooligomer mit Hilfe von Mutagenesestudien konnte bestätigen, dass wie beim nAChR und GABA_AR (siehe Abschnitt 5.3) die Cystein-, die $\beta1\beta2$ - und auch die M2M3-Schleife maßgeblich an der Rezeptoraktivierung beteiligt sind (Schofield et al., 2004, Absalom et al., 2003, Schofield et al., 2003, Lynch et al., 2001). Interessanterweise scheint es aber Unterschiede in der Wechselwirkung der $\beta1\beta2$ - und der Cys-Schleife der N-terminalen Domäne mit der M2M3-Schleife der Transmembranregionen des GlyRs im Vergleich zum nAChR und GABA_AR zu geben. Der Austausch homologer Reste in der GlyR $\alpha1$ -Untereinheit ($\alpha1D148$) zeigte, dass zwar geladene Reste an der Wechselwirkung beteiligt sind, jedoch konnte durch Ladungsumkehr zwischen der M2M3- ($\alpha1K276D/E$) und der $\beta1\beta2$ -Schleife ($\alpha1D148K$) eine ausschließlich elektrostatische Wechselwirkung beider Domänen nicht bestätigt werden (Absalom

et al., 2003, Schofield et al., 2003). Vielmehr wurde eine zusätzliche Beteiligung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen anderen Resten vorgeschlagen. Da die Homologie zwischen den Cystein-, $\beta 1\beta 2$ - und den M2-M3-Schleifen der $\alpha 1$ - und der β -Untereinheit sehr hoch ist (Abb. 5.3), stellt sich die Frage, in wie weit die β -Untereinheit neben der in dieser Arbeit gezeigten Beteiligung an der Ligandenbindung auch einen Beitrag zur Kanalaktivierung leisten kann. Für einen anderen Beitrag als den, der von den α -Untereinheiten geleistet wird, spricht der Unterschied in den Einzelkanalleitfähigkeiten, der bei den Homooligomeren mit 86-112 pS etwa doppelt so groß ist wie bei den Heterooligomeren (um 50 pS) (Burzomato et al., 2004, Bormann et al., 1993). Zusätzlich wurde eine mögliche Konformationsänderung der M2M3-Schleife der β -Untereinheit während der Kanalaktivierung mittels „Cysteinscanning“ untersucht, jedoch konnte keine Reaktivität der M2M3-Schleife der β -Untereinheit festgestellt werden (Shan et al., 2003), was gegen eine Beteiligung der β -Untereinheit an der Kanalaktivierung spricht. Interessanterweise resultierte aber die Mutation eines in der Superfamilie hochkonservierten Leucins in der Transmembrandomäne M2 der β -Untereinheit in einer Affinitätszunahme des Agonisten Glycin (Burzomato et al., 2003, Shan et al., 2003). Da die Affinitätszunahme aber nach Einführung der Mutation in die β -Untereinheit insgesamt geringer ausgeprägt war als bei entsprechender Substitution der $\alpha 1$ -Untereinheit, kann man annehmen, dass sich der Beitrag der β -Untereinheit zur Kanalaktivierung von dem der $\alpha 1$ -Untereinheit unterscheiden muss. Detaillierte kinetische Analysen sollten es aber in Zukunft ermöglichen, die Rolle der β -Untereinheit in der Kanalaktivierung zu entschlüsseln.

5.5 Wirkungsmechanismus partieller Agonisten

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen mit dem partiellen Agonisten Taurin zeigen, dass Glycin und Taurin entgegen früheren Annahmen (Schmieden und Betz, 1995, Schmieden et al., 1992) in der gleichen Bindungstasche binden und mit identischen Resten interagieren. Außerdem erlaubte die Bestimmung der Aktivierungseffizienz von Taurin gegenüber Glycin nach den theoretischen Überlegungen von Colquhoun (1998) die Schlussfolgerung, dass hauptsächlich Mutationen eingeführt wurden, die die Agonistenbindung und weniger die Rezeptoraktivierung beeinflussen. Es stellt sich nun die Frage, wodurch der partielle Agonismus an ligandengesteuerten Ionenkanälen bedingt ist. Hierzu gibt es aber nur

wenige Untersuchungen. Zum einen könnte die Bindung des vollen und des partiellen Agonisten unterschiedliche Konformationsänderungen im Rezeptor induzieren. In der Tat konnte durch Kristallisierung der GluR2-Untereinheit des AMPAR gezeigt werden, dass die Bindung des partiellen Agonisten eine geringer ausgeprägte Konformationsänderung verursacht als die des vollen Agonisten (Jin et al., 2003). Zum anderen könnten beide Agonisten exakt die gleiche Konformationsänderung induzieren, aber eine unterschiedliche Stabilität des aktivierten Zustandes bedingen. Diese Hypothese wird durch die Untersuchung am GlyR gestützt, in der die agonisteninduzierte Konformationsänderung der M2M3-Schleife durch Cysteinscanning analysiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass diese Konformationsänderung unabhängig vom verwendeten Agonisten ist (Han et al., 2004). Zusätzlich konnten Einzelkanalmessungen zeigen, dass Taurin im Vergleich zu Glycin eine geringere Öffnungsrate hat, wobei die Schließrate nicht verändert ist (Lewis et al., 2003), was wiederum für eine geringere Stabilität des aktiven Zustandes spricht. Eine weitere Hypothese zur Ursache des partiellen Agonismus von Taurin wurde von Schmieden und Betz (1995) aufgestellt. Diese Arbeit führte den partiellen Agonismus von β -Aminosäuren auf unterschiedliche Konformationen, nämlich cis und trans, zurück. So wurde vorgeschlagen, dass die dem vollen Agonisten ähnliche cis-Konformation aktivierend, die trans-Konformation dagegen inhibierend wirkt (Schmieden und Betz, 1995). Diese Hypothese bietet aber keine generelle Erklärung, denn nicht alle partiellen Agonisten können in beiden Konformationen vorliegen. Auch die Tatsache, dass der partielle Agonismus von Taurin vom Expressionssystem abhängt, spricht gegen diese Hypothese. Die Lipidzusammensetzung der Membran, die in den verschiedenen Expressionssystemen variiert, wirkt sich vermutlich mehr auf die Konformation der Transmembrandomänen oder die Kopplung von Ligandenbindungstasche mit den Transmembrandomänen und weniger auf die Konformation der N-terminalen Domäne und insbesondere der 40 Å entfernten Ligandenbindungstasche aus (Unwin, 2005). Damit dürfte die Expression in HEK293-Zellen nicht eine inhibitorische Bindungstasche selektiv zerstören. Die von Schmieden und Betz aufgestellte Hypothese könnte aber soweit zutreffen, dass ein Übergang von cis- zur trans-Konformation des Taurins die Stabilität des aktivierten Zustandes reduziert. Welche dieser genannten Hypothesen zutrifft, kann erst geklärt werden, wenn der genaue

Mechanismus der Rezeptoraktivierung unter dynamischen Bedingungen mit dem vollen und partiellen Agonisten gelöst werden kann.

5.6 Wirkungsmechanismus von kompetitiven Antagonisten

Der Wirkungsmechanismus von kompetitiven Antagonisten wurde bisher nur in der iGluR-Familie strukturell aufgeklärt. Mit Hilfe der Ko-Kristallisation konnte gezeigt werden, dass der Antagonist die Schließung der S1S2-Domänen nach dem Venus-Fliegenfallmechanismus im Gegensatz zum Agonisten verhindert (Armstrong und Gouaux, 2000). Der Antagonismus in der Superfamilie der nAChR ist dagegen weitgehend ungeklärt. Zwar wurden durch zahlreiche Mutagenesestudien an der Antagonistenbindung beteiligte Aminosäurereste (Smit et al., 2001, Arias, 2000) identifiziert; da aber der Aktivierungsmechanismus bislang nur partiell bekannt ist, kann über die antagonistische Wirkung von Liganden an nAChR nur spekuliert werden. Vergleicht man die in dieser Arbeit generierten, mit Glycin und Strychnin ligandierten Modelle, so kann man feststellen, dass nur einige Unterschiede zu finden sind. So ist die äußere C-Schleife im Strychninmodell weiter von der Bindungstasche entfernt als im Glycinmodell. Alle anderen Reste hingegen zeigen nur geringe Veränderungen ihrer Orientierung in beiden ligandierten Zuständen. Eine Ausnahme bildet das $\alpha 1Y202$, denn dieser Rest zeigt im Strychninmodell eine stark veränderte Orientierung im Vergleich zum Glycinmodell (vgl. Abb. 4.6 und 4.8A). Allerdings basiert das Modell selbst auf einer mit dem agonistenähnlichen Molekül HEPES ligandierten Struktur, die einem aktivierten oder desensitisierten Zustand entsprechen kann. Damit ist eine Interpretation über Konformationsänderung im agonisten- oder antagonistengligandierten Zustand schwierig. Interessanterweise ist auch die antagonistische Wirkung des Modulators MBN durch Wechselwirkungen mit den gleichen Aminosäureseitenketten begründet wie bei Strychnin. Ein Vergleich der mit Strychnin und MBN ligandierten Modelle ist nur bedingt möglich, da beide Modelle in verschiedenen Arbeitsgruppen mit leicht voneinander abweichenden Sequenzvergleichen generiert wurden. Auffällig ist aber, dass beide Liganden eine starke Wechselwirkung mit dem Rest $\alpha 1R131$ eingehen, der für die Bindung von Agonisten nicht erforderlich ist. Nach den bisherigen Untersuchungen erfolgt die Aktivierung der nAChR durch eine Bewegung der auf der (+)Seite lokalisierten α -Untereinheit bzw. durch die Bewegung der C-Schleife. Diese Bewegung muss durch

die Wechselwirkung mit spezifischen Resten und dem Antagonisten verhindert oder stark eingeschränkt werden.

5.7 Neue Stöchiometrie des heterooligomeren GlyRs

Die durch homologe Substitutionen in der $\alpha 1$ und β -Untereinheit bedingten Affinitätsverschiebungen (siehe Abschnitt 4.3) waren nicht mit der bisherigen $3\alpha:2\beta$ Glycinrezeptorstöchiometrie vereinbar (Burzomato et al., 2003, Langosch et al., 1988). Deshalb sollte die Stöchiometrie des heterooligomeren GlyRs näher untersucht werden. Hierzu wurde eine Tandemuntereinheit durch Fusion des C-Terminus der $\alpha 1$ -Untereinheit mit dem N-Terminus der β -Untereinheit generiert. Die Expression der Tandemuntereinheit alleine resultierte in keinem funktionellen Rezeptor. Nur im Fall der Koexpression mit der Wildtyp β -Untereinheit, nicht aber mit den $\alpha 1$ -Mutanten $\alpha 1R65A$ und $\alpha 1E157D$, wurde ein funktioneller Rezeptor erhalten, der sich in seiner apparenten Glycinaffinität nicht vom Wildtyp $\alpha 1\beta$ GlyR unterschied. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Stöchiometrie des heterooligomeren GlyRs nicht $3\alpha:2\beta$, sondern $2\alpha:3\beta$ sein muss. Um diese neue Stöchiometrie mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Günther Schmalzing (Technische Universität, Aachen) die Stöchiometrie des heterooligomeren GlyRs mit biochemischen Methoden untersucht (Grudzinska et al., 2005). Hierzu wurden die His-getaggte β - und die nicht-getaggte α -Untereinheit sowie beide His-getagkten Untereinheiten in *Xenopus* Oozyten exprimiert, mit Hilfe von [^{35}S]Methionin metabolisch markiert und aufgereinigt. Die $\alpha 1$ -Untereinheit besitzt insgesamt 17 Methioninreste, während die β -Untereinheit mit nur 8 Resten ungefähr den halben Methioningehalt hat. Durch Bestimmung des Verhältnisses der Radioaktivitäten in den $\alpha 1$ - und β -Banden des SDS-PAGE-Gels konnte die Rezeptorstöchiometrie bestimmt werden. Dabei wurde ein $\alpha:\beta$ Verhältnis erhalten, welches nur mit einer $2\alpha:3\beta$ Stöchiometrie vereinbar ist. Um auszuschließen, dass die ermittelte Stöchiometrie aufgrund eines Überschusses intrazellulär lokalisierter β -Untereinheiten zustande kam, wurde zusätzlich zu dem oben beschriebenen Experiment auch eine Aufreinigung nach Biotinylierung der Zelloberflächenproteine durchgeführt. Damit wurden also nur die metabolisch markierten Untereinheiten aufgereinigt, die als funktionelle und damit zum Pentamer assemblierte Rezeptoren an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Auch in diesem Fall wurde ein

Radioaktivitätsverhältnis beider Banden gefunden, das nur mit einer $2\alpha:3\beta$ Stöchiometrie erklärbar ist. Wie bereits oben beschrieben, stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu der bisher angenommen GlyR-Stöchiometrie. Die erste Bestimmung der Stöchiometrie erfolgte von Langosch und Kollegen 1988, indem der GlyR aus adultem Rückenmark mit Hilfe von Aminostrychninsäulen aufgereinigt, reversibel quervernetzt und anschließend wieder gespalten wurde (Langosch et al., 1988). In diesem Fall wurde nicht berücksichtigt, dass im adulten Gewebe auch $\alpha 1$ -Homooligomere, die sich in ihrer Strychninaffinität nicht von den Heterooligomeren unterscheiden, vorhanden sein können. Somit wurde der Beitrag von homooligomeren $\alpha 1$ -Untereinheiten enthaltenden Rezeptoren zur Untereinheitenstöchiometrie heterooligomer GlyRs wahrscheinlich überbewertet. Interessanterweise wurden beim Vernetzen der Untereinheiten nicht nur Pentamere sondern auch ein Intermediat mit dem Molakulargewicht von 116 kD detektiert (Langosch et al., 1988), was einem Dimer von zwei β -Untereinheiten entspricht. Wie die Experimente mit der Tandemuntereinheit zeigen, sind α - und β -Untereinheiten alternierend im Pentamer angeordnet (siehe Abb. 4.18, S. 78), d.h. ein β -Dimer kann nur dann entstehen, wenn die Rezeptorstöchiometrie $2\alpha:3\beta$ entspricht. In einer anderen Untersuchung zur Bestimmung der Stöchiometrie wurde die Affinitätszunahme nach Einführung einer Mutation innerhalb der Transmembrandomäne M2 charakterisiert (Burzomato et al., 2003). Die Mutation eines in der ganzen Superfamilie der nAChR konservierten Leucins zum Threonin in der $\alpha 1$ - und der β -Untereinheit hatte eine höhere Affinitätszunahme zur Folge, wenn sie in die $\alpha 1$ -Untereinheit eingeführt wurde. Daraus wurde geschlossen, dass die Stöchiometrie des Rezeptors $3\alpha:2\beta$ sein muss. Das Problem in diesem Fall ist aber, dass man annehmen muss, dass die $\alpha 1$ - und β -Untereinheiten exakt den gleichen Beitrag zur Kanalaktivierung leisten. Wie im vorhergehenden Abschnitt diskutiert, gibt es hierfür bislang keinerlei Evidenzen. Im Gegenteil, alle bisher durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die β -Untereinheit eine andere Rolle in der Kanalaktivierung einnimmt als die α -Untereinheit (Shan et al., 2003, Bormann et al., 1993).

5.8 Assemblierung der β -Untereinheit

Die Assemblierung von Transmembranproteinen schließt vor- und nachgeschaltete Prozesse wie Proteinfaltung, Insertion in die Membran des ER und posttranslationaler Modifikation ein und ist ein streng regulierter Prozess (Green und Millar, 1995). In der Mehrzahl der bisherigen Untersuchungen mit heterooligomeren GlyRs konnte gezeigt werden, dass nach heterologer Expression die β -Untereinheit, im Gegensatz zu den α -Untereinheiten, nicht in der Lage ist, einen funktionellen Rezeptor zu bilden (Bormann et al., 1993, Kuhse et al., 1993). Jedoch war bislang unklar, in welchem Assemblierungszustand diese Untereinheit vorliegt. In dieser Arbeit konnte mit biochemischen Methoden gezeigt werden, dass die β -Untereinheit nicht in der Lage ist, Pentamere zu bilden. Auch Oligomere mit niedrigerem Untereinheitengehalt konnten vor oder nach Dissoziation durch SDS nicht detektiert werden. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die fehlende Funktionalität der β -Untereinheit auf einer Defizienz in der Assemblierung zum Pentamer basiert. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die starke Tendenz zur Aggregation die Bildung von Pentameren der β -Untereinheit nicht detektiert wurden. Ein weiterer Hinweis für eine fehlende Assemblierung und den Verbleib der β -Untereinheit im ER wurde durch die Analyse des Glykosylierungszustandes gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass die β -Untereinheit im Gegensatz zur $\alpha 1$ -Untereinheit nach Expression in Oozyten nicht komplex glykosyliert wird. Die β -Untereinheit enthält innerhalb der extrazellulären N-terminalen Domäne zwei putative Glykosylierungsstellen an $\beta N33$ und $\beta N220$ (Grenningloh et al., 1990a). Die Veränderung des Molekulargewichtes um ca. 4 kD nach Deglykosylierung impliziert, dass nur eine dieser beiden Stellen genutzt wird. Welches der beiden Asparagine glykosyliert wird, kann in Zukunft mit Hilfe zielgerichteter Mutagenese geklärt werden.

5.9 Tandemuntereinheiten - Eine generelle Methode zur Stöchiometriebestimmung

Die hier verwendete Methode der Generierung von Tandemuntereinheiten zur Stöchiometriebestimmung wurde zum ersten Mal bei K^+ -Kanälen eingesetzt (Hurst et al., 1992, Liman et al., 1992). In der Gruppe der ligandengesteuerten Ionenkanäle wurde sie bei den P2XR (Nicke et al., 2003, Newbolt et al., 1998) und in der Superfamilie der nAChR sehr ausgiebig bei den GABA_AR (Minier und Sigel, 2004)

und den nAChR (Nelson et al., 2003, Zhou et al., 2003), genutzt. Jedoch muss bei der Verwendung von Tandemuntereinheiten überprüft werden, ob innerhalb der Untereinheiten, insbesondere im Bereich des Linkers, keine proteolytische Spaltung erfolgt (Nicke et al., 2003). In dieser Arbeit erfolgte diese Kontrolle mittels Westernblotting; es konnte keine Bande, die Spaltprodukten entspricht, detektiert werden. Zusätzlich war das Tandemkonstrukt bei alleiniger Expression nicht funktionell. Wäre es zu einer Spaltung in der Linkerregion gekommen, so hätte das in funktionellen $\alpha 1$ -Homomeren resultieren müssen. Mit diesen Kontrollexperimenten wurde auch ein weiteres Problem, das bei Verwendung von Tandemuntereinheiten auftreten kann, ausgeschlossen. Bei der Generierung von Tandemuntereinheiten ist die Linkerlänge sehr kritisch. Wählt man ihn zu kurz, so können keine funktionellen Untereinheiten entstehen. Ist er aber zu lang, so kann es passieren, dass beide Untereinheiten unabhängig voneinander assemblieren. In diesem Fall würde sich die Interpretation von Koexpressionsexperimenten als schwierig erweisen, weil nicht bekannt wäre, ob das Tandemkonstrukt tatsächlich mit sich selbst oder mit koexprimierten Untereinheiten assembliert. Da in unserem Fall die Tandemuntereinheit nur nach Koexpression mit der β -Untereinheit in einem funktionellen Rezeptor resultierte, kann man davon ausgehen, dass die Linkerlänge von 21 Aminosäuren, die einer Länge im ausgestreckten Zustand von ca. 80 Å entspricht (Minier und Sigel, 2004), optimal gewählt wurde.

5.10 Regulation der Assemblierung in der Superfamilie der nAChR

Die hier neu bestimmte Stöchiometrie des GlyRs steht im Widerspruch zu den bisherigen Ergebnissen. Man könnte also annehmen, dass die Stöchiometrie des Rezeptors variabel ist. Tatsächlich wurde beim neuronalen nAChR gefunden, dass nach transienter Überexpression in heterologen Systemen je nach Überschuss von α - oder β -Untereinheiten die Stöchiometrie entweder 2:3 oder 3:2 betragen kann (Nelson et al., 2003). Andererseits scheint bei allen anderen Mitgliedern der Superfamilie die Stöchiometrie der Rezeptoren eindeutig festgelegt zu sein (Bollan et al., 2003, Millar, 2003). Auch beim GlyR konnte gezeigt werden, dass die Stöchiometrie heterooligomerer Rezeptoren invariant ist (Kuhse et al., 1993). Bei Überschuss der β -Untereinheit oder einem gleichen Verhältnis der $\alpha 2G167L$ -Mutation und der β -Untereinheit änderte sich der EC_{50} -Wert der resultierenden Rezeptoren nicht. Dieses Ergebnis hat gezeigt, dass der heterooligomere

Glycinrezeptor eine feste Stöchiometrie hat, die durch Überexpression einzelner Untereinheiten nicht verschoben werden kann.

Im Gegensatz zum GlyR bestehen alle anderen Mitglieder der nAChR-Superfamilie i.d.R. aus mehreren Untereinheiten, wobei beim nAChR bisher insgesamt fünf und beim GABA_AR sieben verschiedene Untereinheiten identifiziert wurden (Le Novère und Changeux, 2001, Ortells und Lunt, 1995). Die Diversität wird außerdem durch mehrere Isoformen und Spleißvarianten erhöht. Damit könnten beispielsweise bis zu 16⁵ unterschiedliche GABA_A-Rezeptoren gebildet werden. Diese theoretisch mögliche, hohe Anzahl an Rezeptoren wird aber *in vivo* nicht beobachtet, d.h. es muss eine strenge Regulation der Assemblierung vorhanden sein, welche auch die pharmakologischen Eigenschaften des jeweiligen Rezeptors determiniert (Burt, 2005). Diese Regulation kann auf unterschiedlichem Wege erfolgen. Zum einen ist die Expression einiger Untereinheiten entwicklungspezifisch geregelt. So besteht der muskuläre nAChR in der Embryonalphase aus α -, β -, γ - und δ -Untereinheiten, während die adulte Rezeptorform statt der γ - die ϵ -Untereinheit enthält (Karlin, 2002). Auch beim GlyR ist eine solche Entwicklungsregulation vorhanden, denn im Embryonalstadium werden vorwiegend homooligomere $\alpha 2$ -GlyRs exprimiert (Takahashi et al., 1992, Hoch et al., 1989, Becker et al., 1988), die ca. zwei Wochen nach der Geburt durch die adulte Form des Rezeptors bestehend aus $\alpha 1$ - und β -Untereinheiten ersetzt wird (Malosio et al., 1991b, Becker et al., 1988). Zum anderen kann die Diversität der Rezeptoren durch eine gewebespezifische Expression von Untereinheiten eingeschränkt werden. So werden z.B. beim GABA_AR $\alpha 6$ -Untereinheiten ausschließlich in Körnerzellen des Cerebellums exprimiert (Laurie et al., 1992), während man beim nAChR zwischen muskulären und neuronalen Untereinheiten unterscheidet (Millar, 2003). Beim GlyR wird das Glrb-Gen innerhalb des ZNS ubiquitär exprimiert (Fujita et al., 1991, Malosio et al., 1991b), während die α -Untereinheitenexpression regionalspezifisch reguliert wird (Harvey et al., 2004, Malosio et al., 1991b). Beispielsweise erfolgt die Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit hauptsächlich im Hinterhorn des Rückenmarks (Harvey et al., 2004).

Eine weitere Form der Assemblierungsregulation muss in Form spezifischer Determinanten in jeder Rezeptoruntereinheit vorhanden sein. Denn trotz der hohen

Untereinheitendiversität, sind z.B. nur die $\alpha 7$ -, $\alpha 8$ - und $\alpha 9$ -Untereinheiten des nAChR (Couturier et al., 1990, Seguela et al., 1993, Elgoyhen et al., 1994), die $\beta 3$ -Untereinheit des GABA_AR (Taylor et al., 1999), die $\rho 1-2$ -Untereinheiten des GABA_CR (Chebib, 2004) und die $\alpha 1-4$ -Untereinheiten des GlyRs (Grenningloh et al., 1990b, Kuhse et al., 1990a und b, Sontheimer et al., 1989) in der Lage einen homooligomeren Rezeptor zu bilden, d.h. alle anderen Untereinheiten müssen Signale tragen, die eine Assemblierung mit gleichen Untereinheiten verhindern. Tatsächlich konnten durch Sequenzvergleich von Untereinheitenisoformen solche Signale identifiziert werden. So hat die $\beta 3$ -Untereinheit des GABA_AR ein aus vier Aminosäuren bestehendes Motiv, das nach Einführung in die $\beta 2$ -Untereinheit die Bildung von Homopentameren ermöglicht, obwohl diese Untereinheit normalerweise nur in Heterooligomeren zu finden ist (Taylor et al., 1999). In der β -Untereinheit des GlyRs wurden ebenfalls Sequenzen identifiziert, die eine Homooligomerisierung verhindern (Griffon et al., 1999, Kuhse et al., 1993). Auch die Heterooligomerisierung ist streng reguliert, denn nach transienter Expression in heterologen Systemen, in denen keine entwicklungs- oder gewebespezifische Regulation erfolgen kann, sind nicht alle Untereinheiten des GABA_AR und nAChR in der Lage miteinander zu assemblieren (Bollan et al., 2003, Millar, 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Assemblierung zum Heterooligomer um einen sequenziellen Vorgang handelt (Green und Claudio, 1993). Beim muskulären Typ des nAChR entstehen die Kontaktstellen in bestimmter Reihenfolge. Zunächst entsteht die $\alpha\gamma$ Kontaktstelle, aus der dann das Trimer $\alpha\gamma\beta$ gebildet wird. Erst nach der vollständigen Assemblierung zum Pentamer wird die zweite ligandenbindende Kontaktstelle an der $\alpha\delta$ -Interphase gebildet (Green und Wanamaker, 1998). Zusätzlich muss es weitere Regulationsmechanismen geben, welche zum einen die Heterooligomerisierung von Untereinheiten ermöglichen, die auch in der Lage sind Homooligomere zu bilden und zum anderen das Assemblieren von nur bestimmten Untereinheiten an bestimmte Intermediate erlauben. Beispielsweise können α - und β -Untereinheiten des GABA_AR funktionelle Rezeptoren bilden. Trotzdem entstehen *in vivo* hauptsächlich heterooligomere Rezeptoren, die neben diesen beiden Untereinheiten auch die γ -Untereinheit enthalten (Connolly et al., 1996, Macdonald und Olsen, 1994, Angelotti und Macdonald, 1993). Beim GlyR können die α -Untereinheiten effizient Homopentamere bilden, dennoch werden Heterooligomere durch die Assemblierung

mit der β -Untereinheit gebildet. Über Mechanismen, welche diese „Assemblierungshierarchie“ ermöglichen, kann nur spekuliert werden. Zum einen mögen entstehende Assemblierungsintermediate über verschiedene Affinitäten für weiter hinzukommende Untereinheiten verfügen. Zum anderen könnten die nach der Synthese mit den Untereinheiten assoziierten Chaperone (Connolly et al., 1996, Gelman und Prives, 1996, Blount und Merlie, 1991) die Assoziation mit bestimmten Untereinheiten steuern.

5.11 Fazit

In dieser Arbeit konnten durch Kombination von zielgerichteter Mutagenese mit elektrophysiologischen Methoden wichtige Reste der Ligandenbindung am $\alpha 1$ homo- und $\alpha 1\beta$ heterooligomen GlyR identifiziert werden. Durch Vergleich der resultierenden Affinitätsreduktionen mit Modellen der N-terminalen Domänen beider Untereinheiten konnten zum ersten Mal die molekularen Wechselwirkungen der jeweiligen Liganden mit dem Rezeptor aufgeklärt werden. Der Vergleich von Affinitätsverschiebungen nach Substitution homologer Reste der $\alpha 1$ - und der β -Untereinheiten wies auf eine neue Stöchiometrie des heterooligomeren GlyRs hin. Weitere Untersuchungen der Stöchiometrie mittels Expression einer Tandemuntereinheit $(\alpha\beta)_T$ bestätigten die Untereinheitenstöchiometrie von $2\alpha:3\beta$. Diese Ergebnisse belegen eine dominante und damit unerwartete Rolle der β -Untereinheit in heterooligomeren Glycinrezeptoren.

6. Literatur

- Absalom, N. L., Lewis, T. M., Kaplan, W., Pierce, K. D. und Schofield, P. R. (2003). Role of charged residues in coupling ligand binding and channel activation in the extracellular domain of the glycine receptor. *J Biol Chem* 278, 50151-50157.
- Akagi, H., Hirai, K. und Hishinuma, F. (1991). Functional properties of strychnine-sensitive glycine receptors expressed in *Xenopus* oocytes injected with a single mRNA. *Neurosci Res* 11, 28-40.
- Akaike, N., Hattori, K., Inomata, N. und Oomura, Y. (1985). gamma-Aminobutyric-acid- and pentobarbitone-gated chloride currents in internally perfused frog sensory neurones. *J Physiol* 360, 367-386.
- Angelotti, T. P. und Macdonald, R. L. (1993). Assembly of GABAA receptor subunits: alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 1 gamma 2S subunits produce unique ion channels with dissimilar single-channel properties. *J Neurosci* 13, 1429-1440.
- Aprison, M. H. (1990). The discovery of the neurotransmitter role of glycine. In *Glycine neurotransmission*, O. P. Otterson, Storm-Mathiesen J., ed. (New York, John Wiley), S. 1-23.
- Arias, H. R. (2000). Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. *Neurochem Int* 36, 595-645.
- Armstrong, N. und Gouaux, E. (2000). Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* 28, 165-181.
- Armstrong, N., Sun, Y., Chen, G. Q. und Gouaux, E. (1998). Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* 395, 913-917.
- Beato, M., Groot-Kormelink, P. J., Colquhoun, D. und Sivilotti, L. G. (2002). Openings of the rat recombinant alpha 1 homomeric glycine receptor as a function of the number of agonist molecules bound. *J Gen Physiol* 119, 443-466.
- Becker, C. M. (1992). Convulsants acting at the inhibitory glycine receptor. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, F. H. H. Herken, ed. (Heidelberg, Germany, Springer), S. 539-575.
- Becker, C. M., Hoch, W. und Betz, H. (1988). Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. *EMBO J* 7, 3717-3726.
- Betz, H. (1990). Ligand-gated ion channels in the brain: the amino acid receptor superfamily. *Neuron* 5, 383-392.
- Biro, T. und Maksay, G. (2004). Allosteric modulation of glycine receptors is more efficacious for partial rather than full agonists. *Neurochem Int* 44, 521-527.

- Bloomenthal, A. B., Goldwater, E., Pritchett, D. B. und Harrison, N. L. (1994). Biphasic modulation of the strychnine-sensitive glycine receptor by Zn^{2+} . *Mol Pharmacol* 46, 1156-1159.
- Blount, P. und Merlie, J. P. (1991). BIP associates with newly synthesized subunits of the mouse muscle nicotinic receptor. *J Cell Biol* 113, 1125-1132.
- Bollan, K., Robertson, L. A., Tang, H. und Connolly, C. N. (2003). Multiple assembly signals in gamma-aminobutyric acid (type A) receptor subunits combine to drive receptor construction and composition. *Biochem Soc Trans* 31, 875-879.
- Bormann, J., Rundstrom, N., Betz, H. und Langosch, D. (1993). Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *EMBO J* 12, 3729-3737.
- Bouzat, C. et al. (2004). Coupling of agonist binding to channel gating in an ACh-binding protein linked to an ion channel. *Nature* 430, 896-900.
- Brejck, K., van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A. B. und Sixma, T. K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411, 269-276.
- Burt, D. R. (2005). Alpha subunit position and GABA receptor function. *Sci STKE* 2005, pe5.
- Burzomato, V., Beato, M., Groot-Kormelink, P. J., Colquhoun, D. und Sivilotti, L. G. (2004). Single-channel behavior of heteromeric $\alpha 1\beta$ glycine receptors: an attempt to detect a conformational change before the channel opens. *J Neurosci* 24, 10924-10940.
- Burzomato, V., Groot-Kormelink, P. J., Sivilotti, L. G. und Beato, M. (2003). Stoichiometry of recombinant heteromeric glycine receptors revealed by a pore-lining region point mutation. *Receptors Channels* 9, 353-361.
- Buttner, C., Sadtler, S., Leyendecker, A., Laube, B., Griffon, N., Betz, H. und Schmalzing, G. (2001). Ubiquitination precedes internalization and proteolytic cleavage of plasma membrane-bound glycine receptors. *J Biol Chem* 276, 42978-42985.
- Celentano, J. J., Gibbs, T. T. und Farb, D. H. (1988). Ethanol potentiates GABA- and glycine-induced chloride currents in chick spinal cord neurons. *Brain Res* 455, 377-380.
- Celie, P. H., van Rossum-Fikkert, S. E., van Dijk, W. J., Brejck, K., Smit, A. B. und Sixma, T. K. (2004). Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* 41, 907-914.
- Changeux, J. P. und Edelstein, S. J. (1998). Allosteric receptors after 30 years. *Neuron* 21, 959-980.
- Chebib, M. (2004). GABAC receptor ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31, 800-804.

- Chesnoy-Marchais, D. (1996). Potentiation of chloride responses to glycine by three 5-HT₃ antagonists in rat spinal neurones. *Br J Pharmacol* 118, 2115-2125.
- Chesnoy-Marchais, D. (1999). Mode of action of ICS 205,930, a novel type of potentiator of responses to glycine in rat spinal neurones. *Br J Pharmacol* 126, 801-809.
- Chesnoy-Marchais, D., Levi, S. und Acher, F. (2000). Glycinergic potentiation by some 5-HT₃ receptor antagonists: insight into selectivity. *Eur J Pharmacol* 402, 205-213.
- Colquhoun, D. (1998). Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure- activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br J Pharmacol* 125, 924-947.
- Colquhoun, D. und Sivilotti, L. G. (2004). Function and structure in glycine receptors and some of their relatives. *Trends Neurosci* 27, 337-344.
- Connolly, C. N., Krishek, B. J., McDonald, B. J., Smart, T. G. und Moss, S. J. (1996). Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem* 271, 89-96.
- Conroy, W. G., Liu, Z., Nai, Q., Coggan, J. S. und Berg, D. K. (2003). PDZ-containing proteins provide a functional postsynaptic scaffold for nicotinic receptors in neurons. *Neuron* 38, 759-771.
- Corringer, P. J., Le Novere, N. und Changeux, J. P. (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 431-458.
- Cromer, B. A., Morton, C. J. und Parker, M. W. (2002). Anxiety over GABA(A) receptor structure relieved by AChBP. *Trends Biochem Sci* 27, 280-287.
- De Saint Jan, D., David-Watine, B., Korn, H. und Bregestovski, P. (2001). Activation of human alpha1 and alpha2 homomeric glycine receptors by taurine and GABA. *J Physiol* 535, 741-755.
- Del Castillo, J., Katz, B. (1957). Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proc Roy Soc Lond B*, 369-381.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. und Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51, 7-61.
- Eisele, J. L., Bertrand, S., Galzi, J. L., Devillers-Thiery, A., Changeux, J. P. und Bertrand, D. (1993). Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 366, 479-483.
- Fujita, M., Sato, K., Sato, M., Inoue, T., Kozuka, T. und Tohyama, M. (1991). Regional distribution of the cells expressing glycine receptor beta subunit mRNA in the rat brain. *Brain Res* 560, 23-37.
- Furukawa, H. und Gouaux, E. (2003). Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *EMBO J* 22, 2873-2885.

- Gao, F. et al. (2005). Agonist-mediated conformational changes in acetylcholine-binding protein revealed by simulation and intrinsic tryptophan fluorescence. *J Biol Chem* 280, 8443-8451.
- Gelman, M. S. und Prives, J. M. (1996). Arrest of subunit folding and assembly of nicotinic acetylcholine receptors in cultured muscle cells by dithiothreitol. *J Biol Chem* 271, 10709-10714.
- Graham, D., Pfeiffer, F. und Betz, H. (1983). Photoaffinity-labelling of the glycine receptor of rat spinal cord. *Eur J Biochem* 131, 519-525.
- Gready, J. E., Ranganathan, S., Schofield, P. R., Matsuo, Y. und Nishikawa, K. (1997). Predicted structure of the extracellular region of ligand-gated ion- channel receptors shows SH2-like and SH3-like domains forming the ligand-binding site. *Protein Sci* 6, 983-998.
- Green, W. N. und Claudio, T. (1993). Acetylcholine receptor assembly: subunit folding and oligomerization occur sequentially. *Cell* 74, 57-69.
- Green, W. N. und Millar, N. S. (1995). Ion-channel assembly. *Trends Neurosci* 18, 280-287.
- Green, W. N. und Wanamaker, C. P. (1998). Formation of the nicotinic acetylcholine receptor binding sites. *J Neurosci* 18, 5555-5564.
- Grenningloh, G., Pribilla, I., Prior, P., Multhaup, G., Beyreuther, K., Taleb, O. und Betz, H. (1990a). Cloning and expression of the 58 kd beta subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron* 4, 963-970.
- Grenningloh, G. et al. (1990b). Alpha subunit variants of the human glycine receptor: primary structures, functional expression and chromosomal localization of the corresponding genes. *EMBO J* 9, 771-776.
- Griffon, N., Buttner, C., Nicke, A., Kuhse, J., Schmalzing, G. und Betz, H. (1999). Molecular determinants of glycine receptor subunit assembly. *EMBO J* 18, 4711-4721.
- Grudzinska, J., Schemm, R., Haeger, S., Nicke, A., Schmalzing, G., Betz, H. und Laube, B. (2005). The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron* 45, 727-739.
- Han, N. L., Clements, J. D. und Lynch, J. W. (2004). Comparison of taurine- and glycine-induced conformational changes in the M2-M3 domain of the glycine receptor. *J Biol Chem* 279, 19559-19565.
- Handford, C. A., Lynch, J. W., Baker, E., Webb, G. C., Ford, J. H., Sutherland, G. R. und Schofield, P. R. (1996). The human glycine receptor beta subunit: primary structure, functional characterisation and chromosomal localisation of the human and murine genes. *Brain Res Mol Brain Res* 35, 211-219.
- Harvey, R. J. et al. (2004). GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304, 884-887.

- Herin, G. A. und Aizenman, E. (2004). Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function. *Eur J Pharmacol* 500, 101-111.
- Hoch, W., Betz, H. und Becker, C. M. (1989). Primary cultures of mouse spinal cord express the neonatal isoform of the inhibitory glycine receptor. *Neuron* 3, 339-348.
- Hurst, R. S., Kavanaugh, M. P., Yakel, J., Adelman, J. P. und North, R. A. (1992). Cooperative interactions among subunits of a voltage-dependent potassium channel. Evidence from expression of concatenated cDNAs. *J Biol Chem* 267, 23742-23745.
- Jin, R., Banke, T. G., Mayer, M. L., Traynelis, S. F. und Gouaux, E. (2003). Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* 6, 803-810.
- Karlin, A. (2002). Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* 3, 102-114.
- Kash, T. L., Dizon, M. J., Trudell, J. R. und Harrison, N. L. (2004). Charged residues in the beta2 subunit involved in GABAA receptor activation. *J Biol Chem* 279, 4887-4893.
- Kash, T. L., Jenkins, A., Kelley, J. C., Trudell, J. R. und Harrison, N. L. (2003). Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA(A) receptor. *Nature* 421, 272-275.
- Kuhse, J., Betz, H. und Kirsch, J. (1995). The inhibitory glycine receptor: architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 5, 318-323.
- Kuhse, J., Kuryatov, A., Maulet, Y., Malosio, M. L., Schmieden, V. und Betz, H. (1991). Alternative splicing generates two isoforms of the alpha 2 subunit of the inhibitory glycine receptor. *FEBS Lett* 283, 73-77.
- Kuhse, J., Laube, B., Magalei, D. und Betz, H. (1993). Assembly of the inhibitory glycine receptor: identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry. *Neuron* 11, 1049-1056.
- Kuhse, J., Schmieden, V. und Betz, H. (1990a). Identification and functional expression of a novel ligand binding subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem* 265, 22317-22320.
- Kuhse, J., Schmieden, V. und Betz, H. (1990b). A single amino acid exchange alters the pharmacology of neonatal rat glycine receptor subunit. *Neuron* 5, 867-873.
- Kumar, D. V., Nighorn, A. und St John, P. A. (2002). Role of Nova-1 in regulating alpha2N, a novel glycine receptor splice variant, in developing spinal cord neurons. *J Neurobiol* 52, 156-165.
- Kung, A. Y., Rick, C., O'Shea, S., Harrison, N. L. und McGehee, D. S. (2001). Expression of glycine receptors in rat sensory neurons vs. HEK293 cells yields different functional properties. *Neurosci Lett* 309, 202-206.

- Langosch, D., Thomas, L. und Betz, H. (1988). Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7394-7398.
- Laube, B., Hirai, H., Sturgess, M., Betz, H. und Kuhse, J. (1997). Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18, 493-503.
- Laube, B., Kuhse, J. und Betz, H. (2000). Kinetic and mutational analysis of Zn²⁺ modulation of recombinant human inhibitory glycine receptors. *J Physiol* 522 Pt 2, 215-230.
- Laube, B., Kuhse, J., Rundstrom, N., Kirsch, J., Schmieden, V. und Betz, H. (1995). Modulation by zinc ions of native rat and recombinant human inhibitory glycine receptors. *J Physiol* 483, 613-619.
- Laurie, D. J., Seeburg, P. H. und Wisden, W. (1992). The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J Neurosci* 12, 1063-1076.
- Le Novere, N. und Changeux, J. P. (2001). LGICdb: the ligand-gated ion channel database. *Nucleic Acids Res* 29, 294-295.
- Legendre, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 58, 760-793.
- Lewis, T. M., Schofield, P. R. und McClellan, A. M. (2003). Kinetic determinants of agonist action at the recombinant human glycine receptor. *J Physiol* 549, 361-374.
- Liman, E. R., Tytgat, J. und Hess, P. (1992). Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9, 861-871.
- Luscher, B. und Keller, C. A. (2004). Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Ther* 102, 195-221.
- Lynch, J. W. (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* 84, 1051-1095.
- Lynch, J. W., Han, N. L., Haddrill, J., Pierce, K. D. und Schofield, P. R. (2001). The surface accessibility of the glycine receptor M2-M3 loop is increased in the channel open state. *J Neurosci* 21, 2589-2599.
- Lynch, J. W., Rajendra, S., Barry, P. H. und Schofield, P. R. (1995). Mutations affecting the glycine receptor agonist transduction mechanism convert the competitive antagonist, picrotoxin, into an allosteric potentiator. *J Biol Chem* 270, 13799-13806.
- Lynch, J. W., Rajendra, S., Pierce, K. D., Handford, C. A., Barry, P. H. und Schofield, P. R. (1997). Identification of intracellular and extracellular domains mediating signal transduction in the inhibitory glycine receptor chloride channel. *EMBO J* 16, 110-120.

- Macdonald, R. L. und Olsen, R. W. (1994). GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17, 569-602.
- Madden, D. R. (2002). The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 3, 91-101.
- Maksay, G., Laube, B. und Betz, H. (1999). Selective blocking effects of tropisetron and atropine on recombinant glycine receptors. *J Neurochem* 73, 802-806.
- Maksay, G., Nemes, P. und Biro, T. (2004). Synthesis of tropeines and allosteric modulation of ionotropic glycine receptors. *J Med Chem* 47, 6384-6391.
- Maley, F., Trimble, R. B., Tarentino, A. L. und Plummer, T. H., Jr. (1989). Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem* 180, 195-204.
- Malosio, M. L., Grenningloh, G., Kuhse, J., Schmieden, V., Schmitt, B., Prior, P. und Betz, H. (1991a). Alternative splicing generates two variants of the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem* 266, 2048-2053.
- Malosio, M. L., Marqueze-Pouey, B., Kuhse, J. und Betz, H. (1991b). Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J* 10, 2401-2409.
- Mascia, M. P., Machu, T. K. und Harris, R. A. (1996). Enhancement of homomeric glycine receptor function by long-chain alcohols and anaesthetics. *Br J Pharmacol* 119, 1331-1336.
- McKernan, R. M. und Whiting, P. J. (1996). Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 19, 139-143.
- Meyer, G., Kirsch, J., Betz, H. und Langosch, D. (1995). Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron* 15, 563-572.
- Mihic, S. J. et al. (1997). Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* 389, 385-389.
- Millar, N. S. (2003). Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans* 31, 869-874.
- Minier, F. und Sigel, E. (2004). Techniques: Use of concatenated subunits for the study of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 25, 499-503.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y. und Unwin, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423, 949-955.
- Nelson, M. E., Kuryatov, A., Choi, C. H., Zhou, Y. und Lindstrom, J. (2003). Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 63, 332-341.
- Newbolt, A., Stoop, R., Virginio, C., Surprenant, A., North, R. A., Buell, G. und Rassendren, F. (1998). Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem* 273, 15177-15182.

- Newell, J. G., McDevitt, R. A. und Czajkowski, C. (2004). Mutation of glutamate 155 of the GABAA receptor beta2 subunit produces a spontaneously open channel: a trigger for channel activation. *J Neurosci* 24, 11226-11235.
- Nicke, A., Baumert, H. G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E. und Schmalzing, G. (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17, 3016-3028.
- Nicke, A., Rettinger, J. und Schmalzing, G. (2003). Monomeric and dimeric byproducts are the principal functional elements of higher order P2X1 concatamers. *Mol Pharmacol* 63, 243-252.
- Nikolic, Z. et al. (1998). The human glycine receptor subunit alpha3. Glra3 gene structure, chromosomal localization, and functional characterization of alternative transcripts. *J Biol Chem* 273, 19708-19714.
- North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82, 1013-1067.
- Oh, B. H., Pandit, J., Kang, C. H., Nikaido, K., Gokcen, S., Ames, G. F. und Kim, S. H. (1993). Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. *J Biol Chem* 268, 11348-11355.
- Ortells, M. O. und Lunt, G. G. (1995). Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* 18, 121-127.
- O'Shea, S. M., Becker, L., Weiher, H., Betz, H. und Laube, B. (2004). Propofol restores the function of "hyperekplexic" mutant glycine receptors in *Xenopus* oocytes and mice. *J Neurosci* 24, 2322-2327.
- Pfeiffer, F., Graham, D. und Betz, H. (1982). Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* 257, 9389-9393.
- Pribilla, I., Takagi, T., Langosch, D., Bormann, J. und Betz, H. (1992). The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *EMBO J* 11, 4305-4311.
- Rajendra, S., Lynch, J. W., Pierce, K. D., French, C. R., Barry, P. H. und Schofield, P. R. (1994). Startle disease mutations reduce the agonist sensitivity of the human inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem* 269, 18739-18742.
- Rajendra, S., Lynch, J. W., Pierce, K. D., French, C. R., Barry, P. H. und Schofield, P. R. (1995a). Mutation of an arginine residue in the human glycine receptor transforms beta-alanine and taurine from agonists into competitive antagonists. *Neuron* 14, 169-175.
- Rajendra, S., Lynch, J. W. und Schofield, P. R. (1997). The glycine receptor. *Pharmacol Ther* 73, 121-146.
- Rajendra, S., Vandenberg, R. J., Pierce, K. D., Cunningham, A. M., French, P. W., Barry, P. H. und Schofield, P. R. (1995b). The unique extracellular disulfide loop of the glycine receptor is a principal ligand binding element. *EMBO J* 14, 2987-2998.

- Rees, M. I. et al. (2002). Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (GLRB). *Hum Mol Genet* 11, 853-860.
- Rundstrom, N., Schmieden, V., Betz, H., Bormann, J. und Langosch, D. (1994). Cyanotriphenylborate: subtype-specific blocker of glycine receptor chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8950-8954.
- Ryan, S. G. et al. (1994). A missense mutation in the gene encoding the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor in the spasmodic mouse. *Nat Genet* 7, 131-135.
- Schagger, H., Aquila, H. und Von Jagow, G. (1988). Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem* 173, 201-205.
- Schagger, H., Cramer, W. A. und von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* 217, 220-230.
- Schmieden, V. und Betz, H. (1995). Pharmacology of the inhibitory glycine receptor: agonist and antagonist actions of amino acids and piperidine carboxylic acid compounds. *Mol Pharmacol* 48, 919-927.
- Schmieden, V., Kuhse, J. und Betz, H. (1992). Agonist pharmacology of neonatal and adult glycine receptor alpha subunits: identification of amino acid residues involved in taurine activation. *EMBO J* 11, 2025-2032.
- Schmieden, V., Kuhse, J. und Betz, H. (1993). Mutation of glycine receptor subunit creates beta-alanine receptor responsive to GABA. *Science* 262, 256-258.
- Schmieden, V., Kuhse, J. und Betz, H. (1999). A novel domain of the inhibitory glycine receptor determining antagonist efficacies: further evidence for partial agonism resulting from self-inhibition. *Mol Pharmacol* 56, 464-472.
- Schofield, C. M., Jenkins, A. und Harrison, N. L. (2003). A highly conserved aspartic acid residue in the signature disulfide loop of the alpha 1 subunit is a determinant of gating in the glycine receptor. *J Biol Chem* 278, 34079-34083.
- Schofield, C. M., Trudell, J. R. und Harrison, N. L. (2004). Alanine-scanning mutagenesis in the signature disulfide loop of the glycine receptor alpha 1 subunit: critical residues for activation and modulation. *Biochemistry* 43, 10058-10063.
- Schroder, S., Hoch, W., Becker, C. M., Grenningloh, G. und Betz, H. (1991). Mapping of antigenic epitopes on the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *Biochemistry* 30, 42-47.
- Shan, Q., Haddrill, J. L. und Lynch, J. W. (2001). A single beta subunit M2 domain residue controls the picrotoxin sensitivity of alphabeta heteromeric glycine receptor chloride channels. *J Neurochem* 76, 1109-1120.

- Shan, Q., Nevin, S. T., Haddrill, J. L. und Lynch, J. W. (2003). Asymmetric contribution of alpha and beta subunits to the activation of alphabeta heteromeric glycine receptors. *J Neurochem* 86, 498-507.
- Singer, J. H. und Berger, A. J. (2000). Development of inhibitory synaptic transmission to motoneurons. *Brain Res Bull* 53, 553-560.
- Sixma, T. K. und Smit, A. B. (2003). Acetylcholine binding protein (AChBP): a secreted glial protein that provides a high-resolution model for the extracellular domain of pentameric ligand-gated ion channels. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32, 311-334.
- Smit, A. B. et al. (2001). A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 411, 261-268.
- Smith, G. B. und Olsen, R. W. (1995). Functional domains of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 16, 162-168.
- Snutch, T. P. (1988). The use of *Xenopus* oocytes to probe synaptic communication. *Trends Neurosci* 11, 250-256.
- Sontheimer, H. et al. (1989). Functional chloride channels by mammalian cell expression of rat glycine receptor subunit. *Neuron* 2, 1491-1497.
- Supplisson, S. und Chesnoy-Marchais, D. (2000). Glycine receptor beta subunits play a critical role in potentiation of glycine responses by ICS-205,930. *Mol Pharmacol* 58, 763-770.
- Takahashi, T., Momiyama, A., Hirai, K., Hishinuma, F. und Akagi, H. (1992). Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels. *Neuron* 9, 1155-1161.
- Takeuchi (1985). Glutamic Acid as an Excitatory Transmitter. In *Perspectives on Neuroscience*, Y. Tsukada, ed. (Springer).
- Taylor, P. M., Thomas, P., Gorrie, G. H., Connolly, C. N., Smart, T. G. und Moss, S. J. (1999). Identification of amino acid residues within GABA(A) receptor beta subunits that mediate both homomeric and heteromeric receptor expression. *J Neurosci* 19, 6360-6371.
- Unwin, N. (2003). Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett* 555, 91-95.
- Unwin, N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol* 346, 967-989.
- Unwin, N., Miyazawa, A., Li, J. und Fujiyoshi, Y. (2002). Activation of the nicotinic acetylcholine receptor involves a switch in conformation of the alpha subunits. *J Mol Biol* 319, 1165-1176.

Vafa, B., Lewis, T. M., Cunningham, A. M., Jacques, P., Lynch, J. W. und Schofield, P. R. (1999). Identification of a new ligand binding domain in the alpha1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Neurochem* 73, 2158-2166.

Vandenberg, R. J., French, C. R., Barry, P. H., Shine, J. und Schofield, P. R. (1992a). Antagonism of ligand-gated ion channel receptors: two domains of the glycine receptor alpha subunit form the strychnine-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1765-1769.

Vandenberg, R. J., Handford, C. A. und Schofield, P. R. (1992b). Distinct agonist- and antagonist-binding sites on the glycine receptor. *Neuron* 9, 491-496.

Vial, C., Roberts, J. A. und Evans, R. J. (2004). Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 25, 487-493.

Yan, Z., Liang, Z., Tomic, M., Obsil, T. und Stojilkovic, S. S. (2005). Molecular determinants of the agonist binding domain of a P2X receptor channel. *Mol Pharmacol* 67, 1078-1088.

Young, A. B. und Snyder, S. H. (1974). The glycine synaptic receptor: evidence that strychnine binding is associated with the ionic conductance mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 4002-4005.

Zhou, Y., Nelson, M. E., Kuryatov, A., Choi, C., Cooper, J. und Lindstrom, J. (2003). Human alpha4beta2 acetylcholine receptors formed from linked subunits. *J Neurosci* 23, 9004-9015.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1.1 Die drei Familien ligandengesteuerter Ionenkanäle. | 3 |
| Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Transmembrantopologie der humanen $\alpha 1$ -Untereinheit des GlyRs. | 5 |
| Abb. 1.3 Liganden des GlyRs. | 7 |
| Abb. 1.4 Kristallstruktur des AChBP. | 15 |
| Abb. 1.5 Modell der N-terminalen Domäne der humanen GlyR $\alpha 1$ -Untereinheit. | 16 |
| Abb. 3.1 Überblick über das Prinzip des QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits. | 31 |
| Abb. 3.2 <i>Xenopus laevis</i> -Weibchen. | 36 |
| Abb. 3.3 Schematische Darstellung des Oozytenexpressionssystems. | 37 |
| Abb. 3.4 Schematische Darstellung des Meßstandes für die elektrophysiologischen Messungen. | 39 |
| Abb. 3.5 Schematische Darstellung des Schaltbilds des Voltage Clamp-Experimentes. | 40 |
| Abb. 4.1 Dosiswirkungskurven des Agonisten Glycin. | 52 |
| Abb. 4.2 Auswirkung der $\alpha 1$ -Mutationen auf die Assemblierung des Rezeptors. | 55 |
| Abb. 4.3 Auswirkung der $\alpha 1$ -Mutationen auf die Glykosylierung des Rezeptors. | 56 |
| Abb. 4.4 Veränderung der apparenten Affinität von Taurin im Vergleich zu Glycin. | 59 |
| Abb. 4.5 Taurineffizienz am homooligomeren $\alpha 1$ -GlyR. | 60 |
| Abb. 4.6 Inhibierungskurven des Antagonisten Strychnin. | 61 |
| Abb. 4.7 Inhibierende Wirkung des Modulators MBN. | 63 |
| Abb. 4.8 Potenzierende Wirkung des Modulators MBN. | 65 |
| Abb. 4.9 Modell der Agonistenbindung am $\alpha 1$ -GlyR. | 67 |
| Abb. 4.10 Modell der Antagonistenbindung am $\alpha 1$ -GlyR. | 68 |
| Abb. 4.11 Assemblierung der β -Untereinheit des GlyRs. | 69 |
| Abb. 4.12 Glykosylierung der β -Untereinheit des GlyRs. | 70 |
| Abb. 4.13 Koexpression der $\alpha 1$ -Mutanten mit der Wildtyp β -Untereinheit. | 71 |
| Abb. 4.14 Strychninbindung an homooligomeren $\alpha 1$ - und heterooligomeren $\alpha 1\beta$ -GlyRs. | 73 |

| | |
|--|----|
| Abb. 4.15 Dosiswirkungskurven des Agonisten Glycin an heterooligomeren $\alpha 1\beta$ -GlyRs. | 75 |
| Abb. 4.16 Inhibierungskurven des Antagonisten Strychnin an heterooligomeren GlyRs. | 77 |
| Abb. 4.17 Modell der Ligandenbindung am $\alpha 1\beta$ -Heterooligomer. | 78 |
| Abb. 4.18 Vergleich von homologen Substitutionen in der $\alpha 1$ - und der β -Untereinheit. | 80 |
| Abb. 4.19 Klonierung der Tandemuntereinheit ($\alpha 1\beta$) _T . | 81 |
| Abb. 4.20 Expression der ($\alpha 1\beta$) _T -Tandemuntereinheit. | 82 |
| Abb. 4.21 Biochemische Untersuchung der Expression des Tandemkonstruktes ($\alpha\beta$) _T in <i>Xenopus</i> Oozyten. | 84 |
| Abb. 5.1 Neue Kristallstruktur des AChBP. | 87 |
| Abb. 5.2 Aktivierungsmechanismus am muskulären nAChR. | 92 |
| Abb. 5.3 Partieller Sequenzvergleich der Mitglieder der nAChR-Superfamilie. | 94 |

7.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab. 2.1 Mutageneseprimer. | 19 |
| Tab. 2.2 Sequenzierprimer. | 20 |
| Tab. 2.3 Verwendete Restriktionsendonukleasen. | 20 |
| Tab. 2.4 Verwendete Enzyme. | 21 |
| Tab. 2.5 Verwendete Kits. | 22 |
| Tab. 2.6 Benutzte Geräte. | 25 |
| Tab. 3.1 PCR-Protokoll. | 32 |
| Tab. 3.2 PCR-Protokoll für die Sequenzierung. | 34 |
| Tab. 3.3 Pipettieranleitung für SDS-PAGE Trenngele. | 46 |
| Tab. 3.4 Pipettieranleitung für SDS-PAGE Sammelgele. | 46 |
| Tab. 4.1 Agonistenbindung am homooligomeren $\alpha 1$ -GlyR. | 53 |
| Tab. 4.2 Strychninbindung am homooligomeren $\alpha 1$ -GlyR. | 62 |
| Tab. 4.3 Wirkung des Modulators MBN. | 64 |
| Tab. 4.4 Pharmakologie der $\alpha 1$ -Mutanten nach Koexpression mit der β -Untereinheit. | 74 |
| Tab. 4.5 Pharmakologie heterooligomerer GlyRs mit Mutationen in der β -Untereinheit. | 76 |
| Tab. 4.6 Expression einer ($\alpha 1\beta$) _T -Tandemuntereinheit. | 83 |

7.3 Abkürzungen

| | |
|------------------|--|
| A | Ampère |
| Abb. | Abbildung |
| AChBP | Acetylcholin-Bindeprotein |
| AChR | Acetylcholinrezeptor |
| Amp | Ampicillin |
| AMPA | α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat |
| As | Aminosäuren |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | Beziehungsweise |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| ddNTP | Didesoxynukleosidtriphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherischia coli</i> |
| EC ₅₀ | halbmaximale Sättigungskonzentration |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| <i>et al.</i> | <i>et altera</i> (und andere) |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| g | Gramm bzw. maximale Erdbeschleunigung |
| GABA | γ -Aminobuttersäure |
| h | Stunde |
| HEPES | Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| I | Strom |
| i. a. | im allgemeinen |
| IC ₅₀ | Konzentration, die zur halbmaximalen Hemmung führt |
| i.d.R. | in der Regel |
| kb | Kilobasenpaare |
| kD | Kilo-Dalton |
| K _D | Dissoziationskonstante |
| K _M | Michaelis-Menten Konstante |
| l | Liter |
| λ | Lambda (-Phage) |
| LB | <i>Luria Bertani</i> |
| μ | Mikro |
| MBN | 3 α -(3'-Methoxybenzoyloxy)nortropan |
| m | Milli |
| ml | Milliliter |
| M | Molar |
| min | Minute |
| mol | Mol |
| mRNA | messenger RNA |
| mV | Millivolt |
| n | Nano bzw. Hillkoeffizient |
| nAChR | nikotinischer Acetylcholinrezeptor |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |

| | |
|-------|--|
| NTP | Nukleotidtriphosphate |
| OD | optische Dichte |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| pH | <i>potentium Hydrogenii</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonukleinase |
| RT | Raumtemperatur |
| SD | Standardabweichung |
| Tab. | Tabelle |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| Tet | Tetracyclin |
| U | Spannung bzw. Einheit für Enzymaktivität |
| UE | Untereinheit |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |
| v/v | Volumenanteil pro Volumen |
| w/v | Gewichtsanteil pro Volumen |
| wt | Wildtyp |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

Die Gewichts- bzw. Mengeneinheiten entsprechen den SI-Einheiten. Die Bezeichnung der Aminosäuren erfolgte nach der internationalen UPAC-Nomenklatur.

7.4 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Joanna Grudzinska
Geburtsdatum: 18.08.1977
Geburtsort: Olsztyn, Polen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNGSDATEN

1984 - 1986 Grundschole in Olsztyn, Polen
1986 - 1988 Grundschole in Bad Vilbel
1988 - 1997 Georg-Büchner-Gymnasium in Bad Vilbel
1997 Abschluss: Abitur
1997 Studienbeginn im Fachbereich Biologie an der J.W. Goethe-Universität in Frankfurt a.M.
1998 Wechsel zum Studiengang Biochemie
1999 Vordiplomsprüfung
Jun. 2001 Diplomprüfung
Jul. 2001-Jan. 2002 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt a.M, Arbeitsgruppe Prof. H. Betz, Titel: „Zielgerichtet Mutagenese und elektrophysiologische Charakterisierung der humanen $\alpha 1$ -Untereinheit des Glycinrezeptors zur Identifizierung von Determinanten der Ligandenbindung.“
Feb. 2002 Beginn der Doktorarbeit, am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt a.M, Arbeitsgruppe Prof. H. Betz

PRAKTISCHE ERFAHRUNGEN

Aug.- Okt. 2000 Auslandspraktikum an der University of East Anglia in Norwich, England

Frankfurt a.M. 16.05.05

7.5 Publikationsliste

Grudzinska, J., Schemm, R., Haeger, S., Nicke, A., Schmalzing, G., Betz, H., and Laube, B. (2005). The β subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron* 45, 727-739.

7.6 Posterpräsentationen

- Nov. 2002 Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting in Orlando, FL.
Determination of Amino Acid Residues Involved in Ligand Binding
of the Glycine Receptor. J. Grudzinska, R. Schemm, B. Laube and H.
Betz.
- Okt. 2004 Society for Neuroscience 34th Annual Meeting in San Diego, CA.
Ligand Binding Properties of Heterooligomeric $\alpha 1\beta$ Glycine
Receptors. J. Grudzinska, R. Schemm, H. Betz and B. Laube.

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Doktorarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Frankfurt a.M., den 27.05.05

Joanna Grudzinska